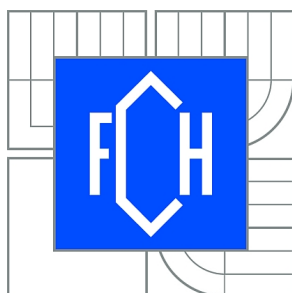




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘEDÚPRAVA POLYSACHARIDICKÝCH ODPADNÍCH MATERIÁLŮ ZA ÚČELEM MAXIMALIZACE PRODUKTŮ HYDROLÝZY

PRETREATMENT OF POLYSACCHARIDE WASTE MATERIALS TO MAXIMIZE OF HYDROLYSIS
PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PAVLA MYSLIVCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Mgr. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0886/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Pavla Myslivcová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Předúprava polysacharidických odpadních materiálů za účelem maximalizace produktů hydrolýzy

Zadání bakalářské práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce
- 2) výběr vhodného odpadu a enzymatického systému
- 3) zpracování metodické části
- 4) provedení experimentů se substrátem různými způsoby přeupraveným ve snaze získat maximální produkt hydrolýzy
- 5) aplikace analytických metod ke stanovení sledovaných látek v odebraných vzorcích
- 6) diskuse, vyhodnocení, závěr

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Pavla Myslivcová
Student(ka)

Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá studiem předúprav polysacharidických odpadních materiálů za účelem maximalizace produktů hydrolýzy. Jako odpadní materiál bylo zvoleno pečivo, konkrétně chléb a rohlíky. Pečivo bylo předupraveno mletím a následně z něj byla připravena 15% w/v suspenze, která byla podrobena několika druhům hydrolýz. Výtěžky jednotlivých hydrolýz byly stanoveny spektrofotometricky metodou podle Somogyi-Nelsona a účinnost hydrolýz byla porovnávána. Pro chemickou hydrolýzu byly použity kyseliny (H_2SO_4 , HNO_3 , HCl) a zásady (NaOH , KOH) o 3 různých koncentracích. Pro fyzikální hydrolýzu byla použita mikrovlnná trouba a ultrazvuk.

ABSTRACT

This thesis deals with study of the polysacharidic waste material pretreatment in order to maximize the hydrolysis products. It has been chosen a pastry as a waste material, specifically rolls and bread. Pastry was pretreated by milling and 15% w/v suspension of pastry in the water was prepared. Then several types of hydrolysis were performed with suspensions. Products of hydrolysis were characterized by spectrophotometric method of Somogyi-Nelson and efficiency of hydrolysis was compared. Three acids (H_2SO_4 , HNO_3 , HCl) and two alkalis (NaOH , KOH) in three various concentration were used for the chemical hydrolysis. Microwave and ultrasound were chosen for the physical hydrolysis.

KLÍČOVÁ SLOVA

odpadní pečivo, chléb, hydrolýza, bioethanol, amylasy

KEYWORDS

bakery waste, bread, hydrolysis, bioethanol, amylasis

MYSLIVCOVÁ, P. Předúprava polysacharidických odpadních materiálů za účelem maximalizace produktů hydrolýzy. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 58 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Mgr. Liboru Babákovi, Ph.D. za vedení a odborné rady. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Heleně Hudečkové za ochotu a věcné připomínky při zpracování experimentální části.

OBSAH

Úvod.....	8
1 Teoretická část	9
1.1 Škrob	9
1.1.1 Složení a struktura škrobu	9
1.1.1.1 Amylosa	9
1.1.1.2 Amylopektin.....	9
1.1.1.3 Škrobová zrna.....	10
1.1.2 Vlastnosti a změny škrobu	11
1.1.2.1 Mazovatění (želatinace)	11
1.1.2.2 Retrogradace	12
1.1.3 Výroba škrobu	12
1.1.4 Použití škrobu.....	13
1.2 Enzymatický aparát.....	13
1.2.1 Rozdělení amylas	13
1.2.2 α -Amylasy	14
1.2.2.1 Molekulové vlastnosti α -amylasy	14
1.2.3 Glukoamylasy.....	15
1.2.3.1 Molekulové vlastnosti glukoamylasy.....	16
1.2.4 Inhibitory amylas.....	16
1.2.5 Produkce amylas	17
1.2.6 Průmyslové využití amylas	17
1.3 Výroba bioethanolu.....	18
1.3.1 Biopaliva	18
1.3.2 Bioethanol ze škrobnatých surovin	19
1.3.3 Bioethanol z lignocelulosových surovin	19
1.3.4 Mikroorganismy produkující bioethanol.....	19
1.3.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.3.4.2 <i>Zymomonas mobilis</i>	21
1.4 Současný stav vědy v oblasti.....	22
1.4.1 Potravinový odpad.....	23

1.4.2	Odpadní pečivo	23
1.4.3	Netradiční škrobnaté suroviny.....	24
1.4.4	Trendy ve využití lignocelulosového odpadu	24
1.4.5	Geneticky modifikované mikroorganismy	25
1.4.6	Fermentace glycerolu	26
1.4.7	Biopaliva třetí generace.....	26
1.4.8	Perspektivy trhu ethanolu.....	27
2	Experimentální část.....	28
2.1	Použité chemikálie	28
2.1.1	Stanovení redukujících cukrů.....	28
2.1.2	Stanovení škrobu podle Ewerse	28
2.1.3	Chemická hydrolýza.....	28
2.2	Materiál na hydrolýzu	28
2.3	Přístroje a pomůcky.....	29
2.4	Software	29
2.5	Příprava roztoků a vzorků	29
2.5.1	Příprava roztoků pro stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi-Nelsona	29
2.5.2	Příprava roztoků pro stanovení škrobů podle Ewerse	29
2.5.3	Mletí pečiva.....	29
2.5.4	Příprava vzorku	30
2.6	Stanovení obsahu škrobu a vlhkosti vzorků.....	30
2.6.1	Stanovení obsahu škrobu podle Ewerse	30
2.6.2	Stanovení vlhkosti vzorku	30
2.7	Hydrolýzy.....	30
2.7.1	Kyselá hydrolýza.....	30
2.7.2	Alkalická hydrolýza	30
2.7.3	Hydrolýza ultrazvukem	31
2.7.4	Hydrolýza mikrovlnami	31
2.8	Stanovení výtěžků hydrolýz.....	31
2.8.1	Analýza metodou podle Somogyi-Nelsona.....	31
2.9	Statistické zpracování výsledků	31

3 Výsledky a diskuse.....	33
3.1 Stanovení obsahu škrobu a vlhkosti ve vzorku	33
3.2 Stanovení redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona	33
3.2.1 Kalibrační křivky	33
3.3 Chemické hydrolýzy	34
3.3.1 Chemická hydrolýza rohlíků	34
3.3.2 Chemická hydrolýza chleba	39
3.4 Fyzikální hydrolýzy	44
3.4.1 Fyzikální hydrolýza rohlíků	45
3.4.2 Fyzikální hydrolýza chleba	46
3.5 Srovnání účinnosti hydrolýz	46
Závěr.....	48
Seznam použitých zdrojů.....	49
Seznam použitých zkratk.....	55
Seznam použitých veličin.....	55
Seznam obrázků	56
Seznam tabulek.....	57
Seznam grafů	58

ÚVOD

Biotechnologické procesy jsou v současné době zdrojem převážné většiny vyrobeného ethanolu. Stále častěji probíraná otázka globálního oteplování vede ke snaze snižovat produkci skleníkových plynů, která je způsobena převážně spalováním fosilních paliv. Náhrada těchto paliv za biopaliva má velký potenciál ve snížení emise oxidu uhličitého. Hledáním nejvhodnějších zdrojů a technologických postupů pro výrobu biopaliv se zabývá velká část světové výzkumné kapacity [1, 2].

Pro výrobu bioethanolu lze použít biomasu obsahující jednoduché přímo zkvasitelné cukry nebo biomasu obsahující polysacharidické látky, které lze přeměnit na jednoduché cukry. Uspořádání a složitost výrobního procesu závisí na výchozím materiálu, tudíž navržené a realizované technologie sahají od jednoduché přeměny sacharidů fermentací po vícestupňovou konverzi biomasy na ethanol [2, 3].

V současné době je bioethanol vyráběn převážně z cukernatých nebo škrobnatých surovin, jelikož úprava lignocelulosové biomasy je zatím ekonomicky méně výhodná. V Evropě a Severní Americe je nejrozšířenější vstupní surovinu pro výrobu bioethanolu škrob [2, 4].

Vzhledem k tomu, že produkce bioethanolu ze škrobnatých surovin se může negativně projevit na ceně potravinových produktů z nich vyráběných, využití potravinového odpadu se jeví jako vhodné řešení. Jednou z nejslibnějších potravin, které běžně končí v odpadu, by mohlo být odpadní pečivo. Pečivo totiž obsahuje značné množství škrobu, který lze rozštěpit na zkvasitelné cukry [5].

Snahou obchodních řetězců je nabídnout zákazníkům stále čerstvé pečivo a je běžné, že se určité procento neprodá. Zbylé pečivo je většinou vráceno zpět do pekáren, kde se nekontaminované pečivo dá využít na výrobu strouhanky, nebo je poskytnuto zemědělcům jako krmivo pro zvířata. Odpadním pečivem se také rozumí nespotřebované pečivo z domácností, jehož množství roste díky nakupování v supermarketech. Lidé dnes nakupují pod tlakem cenově výhodných akcí více jídla, než spotřebují. Průměrné plýtvání pekařskými produkty se odhaduje na 7–10 % světové produkce [6, 7].

Práce se tedy zaměřuje na využití odpadního pečiva jako možného substrátu pro výrobu bioethanolu. Hlavním cílem práce bylo srovnání chemických a fyzikálních hydrolýz za účelem získu co největšího množství jednoduchých sacharidů, které vznikají štěpením škrobu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Škrob

Škrob je hlavní zásobní polysacharid rostlin. Jakožto pohotový zdroj energie je uložen v plastidech buněk, v malém množství v chloroplastech rostlinných pletiv a ve velkém množství v amyloplastech hlíz, kořenů či semen. Nachází se ve formě nerozpustných micel označovaných jako škrobová zrna, která jsou charakteristická pro různé druhy rostlin [8, 9].

1.1.1 Složení a struktura škrobu

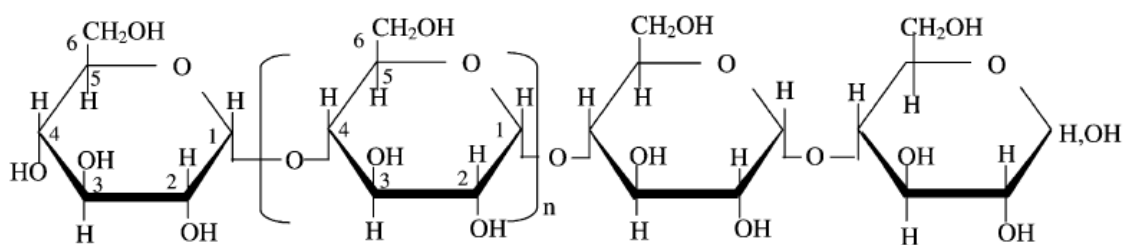
Škrob se skládá ze dvou frakcí, z homopolysacharidů amylosy a amylopektinu, obvykle v hmotnostním poměru 1:3 [8].

1.1.1.1 Amylosa

Lineární řetězec amylosy se skládá z molekul glukosy vzájemně vázaných α -D-(1 \rightarrow 4) vazbami. Mohou se však vyskytovat i vazby α -D-(1 \rightarrow 6), jejichž existence byla dokázána při štěpení amylosy enzymem β -amylasou. Při degradaci vznikala maltosa a β -limitní dextrin, jelikož β -amylasa štěpí pouze vazby α -D-(1 \rightarrow 4) od neredukujícího konce řetězce. Průměrný počet vedlejších řetězců vzniklých větvením je 4–18 [10].

Díky lineárním vazbám je molekula amylosy ve vodě a neutrálních roztocích náhodně svinutá, zatímco v alkalických roztocích převládá globulární struktura. Nejsnadněji vytváří levotočivou šroubovici se 6 glukosovými jednotkami připadajícími na jeden závit. Jako polysacharid je amylosa směsí polymerů o různém stupni polymerace (u obilných škrobů 1 000–2 000) a molekulová hmotnost se pohybuje od 180 do 1 000 kDa [8, 11].

V obilných škrobech se vyskytuje v komplexu s lipidy, jelikož dutý prostor šroubovicové struktury může být vyplněn nepolárním řetězcem mastné kyseliny, která je v lipidech navázána přes karboxylovou skupinu na glycerol [12].



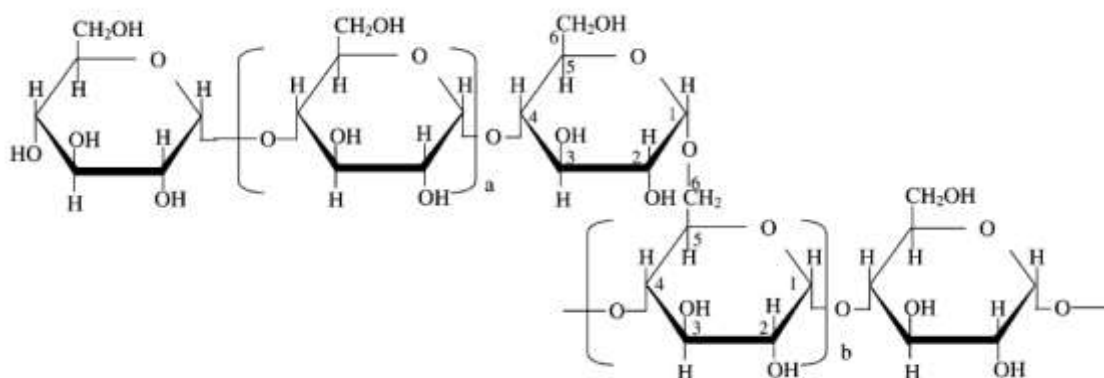
Obrázek 1: Amylosa [13]

1.1.1.2 Amylopektin

Větvená struktura amylopektinu je tvořena hlavním řetězcem glukosových jednotek vázaných α -D-(1 \rightarrow 4) vazbami, na něhož jsou po 10–100 jednotkách navázány vazbou α -D-(1 \rightarrow 6) postranní řetězce glukosy spojené opět vazbou α -D-(1 \rightarrow 4). Výjimečně se objevují i vazby α -(1 \rightarrow 3) [8].

Polymerační stupeň je vyšší než u amylosy (přibližně 50 000–1 000 000) a molekulová hmotnost se pohybuje mezi 10–200 MDa. Větvený charakter má vliv na vnitřní viskozitu, která je tak i přes velkou molekulovou hmotnost nízká [8, 10].

Byly vytvořeny různé modely struktury amylopektinu, které ukazují, že amylopektin je nestejnoměrně větvená molekula. Řetězce amylopektinu lze rozdělit na tři druhy podle základní organizace v mnohočetně větvené struktuře. Vnější řetězce typu A jsou vázány vazbou α -D-(1 \rightarrow 6) na vnitřní řetězce typu B. Jediný řetězec typu C je nosným řetězcem molekuly a nachází se na něm redukující konec rozvětveného řetězce. Podle délky řetězce lze rozlišovat vnější krátké řetězce typu S a vnitřní dlouhé řetězce typu L [10, 14].



Obrázek 2: Amylopektin [13]

1.1.1.3 Škrobová zrna

Škrob se v obilném zrně a v mouce nachází ve formě škrobových zrn. Během zrání obilky se zvětšují makromolekuly amylosy a amylopektinu, dotváří se jejich struktura a tvoří se škrobové granule. Velikost škrobových zrn pšenice je 5 000–40 000 nm a elektronovým mikroskopem lze pozorovat jejich pórovitý povrch [10, 12].

Základním strukturním modelem jsou molekuly amylopektinu uspořádané radiálně od středu zrna k obvodu, přičemž neredukující konce směřují ven z granulí a tvoří jejich povrch. Postupným větvením amylopektinu se tvoří čím dál tím širší keříčky vytvářející růstové kruhy o tloušťce 120–400 nm [9, 12].

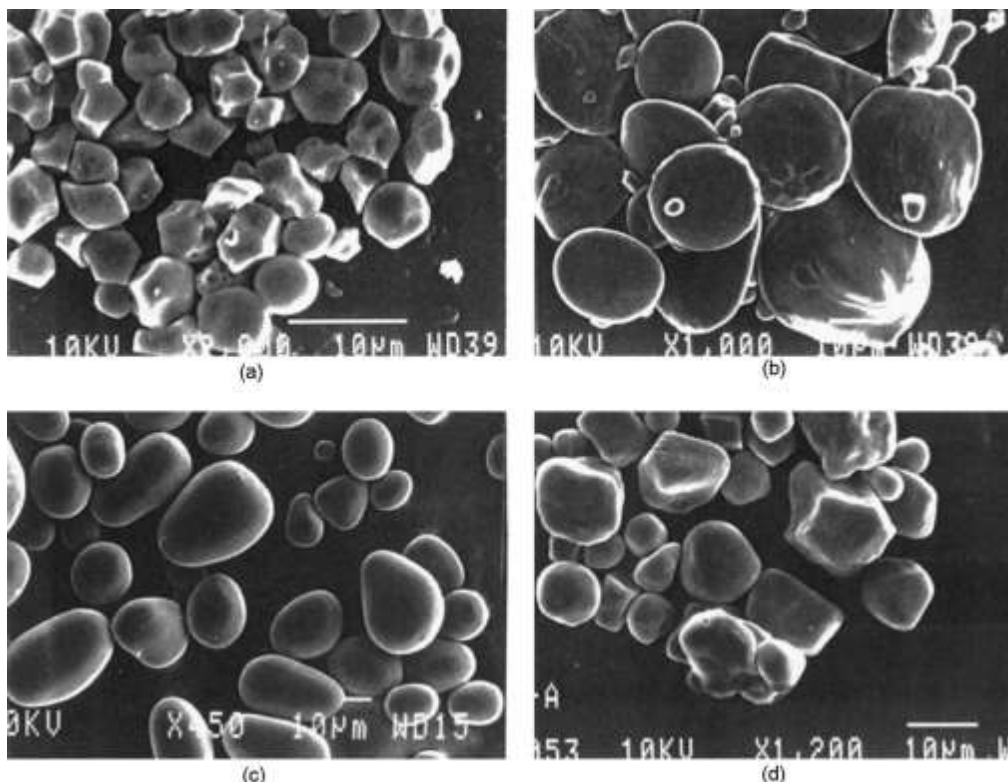
Zatímco v oblastech neredukujících konců a střední části řetězců se vytváří antiparalelní dvojité šroubovice s třírozměrnou strukturou, v místech větvení řetězců je amylopektin i amylosa v neuspořádané amorfnní formě. To má za následek pravidelné střídání krystalických a amorfnních oblastí [8, 12].

Levotočivé šroubovice amylosy se vyskytují obzvláště v amorfnních oblastech spolu s molekulami lipidů. Řetězce jsou orientovány tak, že neredukující konce směřují na povrch škrobových granulí. V povrchových vrstvách škrobových zrn se vyskytuje i malé množství proteinů o relativní molekulové hmotnosti 5–97 kDa [8].

Škrob se vyskytuje ve 4 polymorfnních formách rozlišovaných podle stupně krystalinity. Forma A je nejstabilnější a vyskytuje se u cereálních škrobů, oproti tomu forma B je nejméně stabilní a vyskytuje se například u škrobů brambor a obilovin s obsahem amylosy vyšším než 40 %. U luštěnin se nachází forma C a forma V se vyskytuje v želatinovaných škrobech, kde dochází k interakci amylosy s mastnými kyselinami [8, 9].

U cereálních škrobů pak rozlišujeme dvě velikosti zrn, která se od sebe liší chemickým složením a rozložením amylosy a amylopektinu. Větší zrna čočkovitého tvaru, která se

označují jako A-škrob, mají velikost 20–30 μm . Menší kulovitá zrna B-škrobu mají průměr 2–8 μm [15].



Obrázek 3: Fotografie škrobových zrn z různých zdrojů pořízené rastrovacím elektronovým mikroskopem: a) rýže, b) pšenice, c) brambory, d) kukuřice [16].

1.1.2 Vlastnosti a změny škrobu

Škrob je hygroskopická látka, obilné škroby obsahují za normálních podmínek 14 % relativní vlhkosti. Pevně vázaná krystalická voda činí 8–11 % z celkové vlhkosti a zbytek fyzikálně adsorbovaná a meziprostorová voda [9].

Mezi nejdůležitější fyzikální vlastnosti škrobu patří bobtnání, mazovatění a retrogradace [12].

1.1.2.1 Mazovatění (želatinace)

Škrobová zrna jsou ve vodě nerozpustná, adsorbují jen omezené množství vody a tvoří suspenzi. Se zvyšující se teplotou přijímá škrob více vody, zrna bobtnají, roste viskozita suspenze a snižuje se krystalinita. Děj je stále reverzibilní, dokud teplota nedosáhne želatinační teploty a změny jsou nevratné. Počáteční teplota želatinace leží mezi 50–70 °C. Všechny škroby nezmazovají najednou, ale úplné zmazovatění je dokončeno v intervalu 10–15 °C [8, 12].

K mazovatění dochází nejprve v amorfních oblastech zrna, protože jsou zde oslabeny vodíkové můstky, odkud pokračuje do krystalických oblastí. Během mazovatění pronikají molekuly vody do zrn, která ztrácí svou integritu, hydratované řetězce polymerů se rozpadají a organizovaná struktura přechází v amorfní. Do vody se uvolňují molekuly amylosy, které jsou zde plně hydratovány [8, 16].

Viskozita suspenze roste v důsledku uvolňování amylosy a následně malého množství amylopektinu do prostředí a při koncentraci škrobu alespoň 1 % vzniká škrobový maz obsahující rozrušená zrna. Dalším zvyšováním teploty pokračuje dezintegrace až po ustavení rovnováhy mezi koncentrací makromolekul škrobu ve zbytcích škrobových granulí a ve vodném prostředí [9].

Ochlazováním škrobového mazu viskozita opět roste díky zpětné tvorbě vodíkových můstků mezi makromolekulami amylosy a amylopektinu. Dochází k tvorbě pevné trojrozměrné sítě s velkým množstvím vody uvnitř, která se označuje jako škrobový gel [9].

Na želatinaci má vliv obsah amylosy, jelikož její přítomnost snižuje teplotu tání krystalických oblastí škrobu a tak i energii potřebnou pro začátek želatinace [16].

1.1.2.2 Retrogradace

Opakem želatinace je retrodegradace, která je způsobená změnami ve struktuře amylosy. Při ochlazení zmazovatělého škrobového gelu se postupně vytváří semi-krystalická podoba škrobu lišící se svými vlastnostmi od původního nativního škrobu. Zmazovatělý škrob není v termodynamické rovnováze, což vede ke tvorbě intermolekulárních vodíkových vazeb mezi řetězcí amylosy a amylopektinu. Tím roste viskozita a uvolňuje se původně vázaná voda a vytváří se dvoufázový systém látka-kapalina [8, 17].

Retrogradace je děj trvající delší dobu. Amylosa podléhá retrogradaci v časovém rozmezí několika minut až hodin, zatímco amylopektin v rozmezí hodin až dní v závislosti na schopnosti větvených řetězců sdružovat se [17].

Proces retrogradace lze ovlivnit řadou faktorů, jako je obsah a polymerační stupeň amylosy, teplota, pH nebo obsah vody. Nejsnáze podléhají retrodegradaci gely s 45–50 % vody. Naopak přítomnost solí, jednoduchých cukrů a lipidů snižuje stupeň retrogradace [9].

1.1.3 Výroba škrobu

Škrob není vyráběn v pravém slova smyslu, jelikož je syntetizován rostlinami ze sacharosy, která vzniká v zelených částech rostlin fotosyntézou. Technologie výroby škrobu tak spočívá v jeho izolaci z částí zemědělských plodin, které jsou bohaté na škrob [18, 19].

Prvním krokem výroby bramborového škrobu je rozmělnění hlíz strouháním. Tato takzvaná třenka se vypíráním rozdělí na hlízovou vodu a škrobové mléko, které je následně rafinací zbaveno nečistot, zahuštěno a nakonec je získaný vlhký škrob dosušen [20].

Při použití pšenice jako výchozí suroviny je produktem vedle škrobu i pšeničný lepek, což je hodnotná potravinářská bílkovina. Nejdůležitější frakcí pšeničné mouky, ze které se škrob vyrábí, jsou granule A-škrobu, naopak drobnozrnný B-škrob je v případě potravinářského využití škrobu oddělován. Klasická technologie je založena na vypírání škrobu z hustého těsta. Vypraný lepek je poté sušen a používán pro zlepšení vlastností pekařských mouk. Surové škrobové mléko je zbaveno vlákniny a B-škrobu, zahuštěno a sušeno. Moderní technologie izolace škrobu z pšeničné mouky využívají speciálních dekantačních odstředivek a lze s nimi dosáhnout až 100% využití sušiny [20].

1.1.4 Použití škrobu

Kalorický příjem člověka je tvořen přinejmenším z 35 % právě ze škrobu. Celosvětově je ročně extrahováno přibližně 60 milionů tun škrobu z různých obilovin, hlíz a okopanin. Z toho je zhruba 60 % využito v potravinářském průmyslu a zbylých 40 % v průmyslu farmaceutickém a v mnoha dalších nepotravinářských průmyslových odvětvích [17, 21].

Výrobky ze škrobu lze rozdělit na základě chemických, fyzikálních a biochemických reakcí aplikovaných v molekule škrobu do pěti skupin. První skupinu tvoří produkty frakcionace škrobu, tedy amylosa a amylopektin. Zástupcem další skupiny jsou technické dextriny, které se vyrábějí pražením suchého škrobu za využití kyselin nebo solí jako katalyzátorů. Následující skupinou jsou modifikované škroby. To jsou výrobky získané buď strukturní úpravou škrobového zrna či mazu, nebo chemickými reakcemi funkčních skupin přítomných v molekule škrobu. K dalším výrobkům patří substituované škroby, což jsou deriváty škrobu vzniklé chemickými reakcemi s různými sloučeninami. Poslední skupinou jsou hydrolyzáty škrobu získané hlubokou až úplnou hydrolyzou škrobu [19].

V potravinářském průmyslu mají největší význam hydrolyzáty škrobu a škroby modifikované a substituované. Škroby se používají jako zahušťovadla a stabilizátory mléčných výrobků, jako zlepšující přísada pekařských mouk pro lepší elasticitu lepkové složky, při výrobě cukrovinek jako náhražka želatiny nebo v konzervářském průmyslu jako zahušťovadla kečupů a marmelád, kdy je nutná tepelná odolnost a chemická stabilita [19].

Nepotravinářské využití škrobu také není zanedbatelné. Škrob je využíván jako přísada cementu pro zkrácení doby tuhnutí, v papírenském průmyslu jako plnivo pro zvýšení pevnosti nebo jako lepidlo při výrobě papírových tašek. Dále se uplatňuje například při výrobě hnojiv, textilií nebo bioplastů [17, 21].

1.2 Enzymatický aparát

Většina kvasinek není schopna přímo zkvašovat polysacharidy, ale pouze monosacharidy a některé disacharidy. Pro produkci bioethanolu ze škrobu je tedy nutné rozštěpit glykosidové vazby v řetězci polysacharidu za účelem získání jednoduchých cukrů [22, 23].

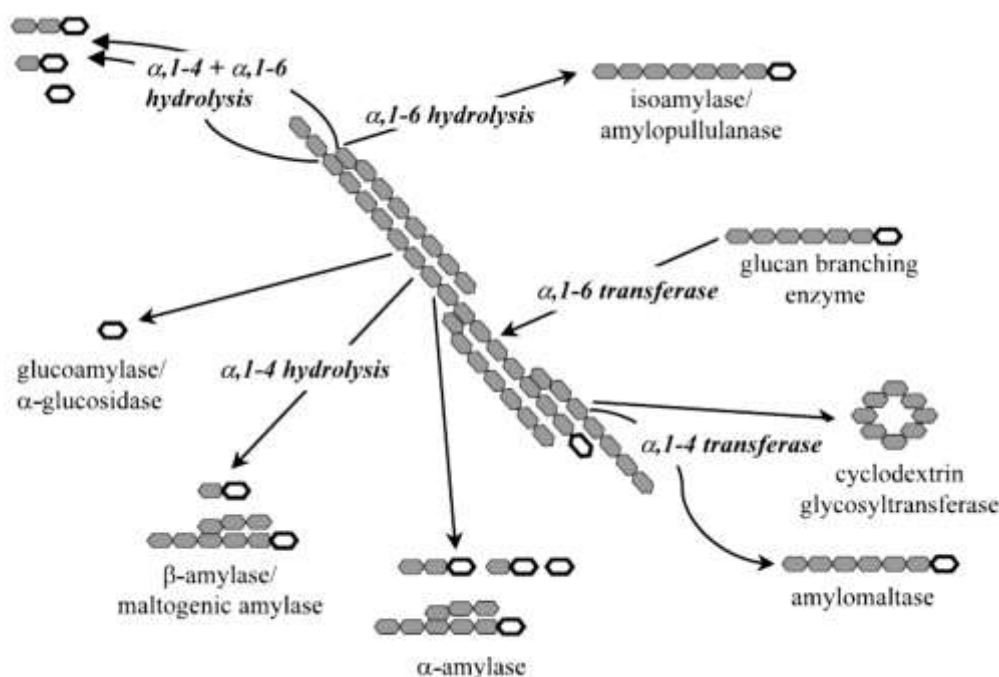
Hydrolyza škrobu může být provedena kyselinami nebo enzymy. Při kyselé hydrolyze je štěpení polysacharidického řetězce škrobu nepravidelné, vzniká směs produktů o různém polymeračním stupni a dochází k vedlejším reakcím glukosy. Více využívána je tedy enzymatická hydrolyza za použití amylolytických enzymů [9].

1.2.1 Rozdělení amylas

Amylasy jsou enzymy katalyzující hydrolyzu α -1,4-glykosidových vazeb ve škrobu, glykogenu a dalších polysacharidech. Podle místa působení a vznikajících produktů lze rozdělit do 3 skupin: α -amylasy, β -amylasy a glukoamylasy [24].

Amylasy představují skupinu velmi významných enzymů produkovaných komerčně, přičemž pokrývají přibližně 25 % trhu s enzymy. Mohou být získávány z různých zdrojů, ale upřednostňovány jsou mikrobiální amylasy díky svým vlastnostem, z nichž je výhodná například větší stabilita oproti amylasám z rostlinných a živočišných zdrojů [25].

Amylasy hrají zásadní roli ve škrobárenském, potravinářském či textilním průmyslu a v biotechnologiích. Při zpracování škrobu se využívá dvoukrokové hydrolýzy, kdy je škrob nejprve ztekucen α -amylasou a poté zcukřen glukooamylasou [24, 26].



Obrázek 4: Druhy enzymů využívané pro degradaci škrobu. Šestiúhelník bez výplně symbolizuje redukující konec sacharidového řetězce [27].

1.2.2 α -Amylasy

α -Amylasy jsou extracelulární enzymy hydrolyzující α -1,4-D-glykosidové vazby uvnitř polymerního řetězce. Štěpení je charakteristické pro α -amylasy různého původu, které mají rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti [24].

Prostudovány jsou hlavně α -amylasy získané ze sladu, slin, vepřového pankreatu a bakterií. Hlavní výhodou využívání mikroorganismů pro produkci α -amylas je snadná manipulace s enzymy za účelem získání enzymů odpovídajících vlastností [24, 28].

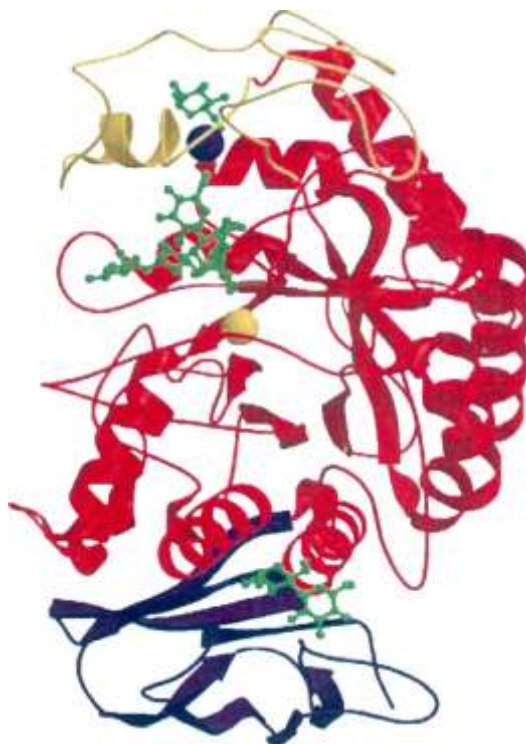
α -Amylasy jsou endoglykosidasy systematicky označované jako 1,4- α -D-glukan-glukanohydrolasa (EC 3.2.1.1). Hydrolytickým štěpením amylosy vzniká směs glukosy a maltosy. Při štěpení amylopektinu vznikají větvené i nevětvené oligosacharidy, přičemž α -1,6-D-glykosidové vazby zůstávají zachovány [29].

1.2.2.1 Molekulové vlastnosti α -amylasy

Lidská α -amylasa je glykoprotein skládající se ze 496 aminokyselin v jednom polypeptidovém řetězci. Počet sacharidů v glykoproteinu má vliv na výslednou molekulovou hmotnost, která je pro pankreatickou amylasu 50 kDa a pro slinnou 51 kDa. Molekulární hmotnost mikrobiální amylasy je pak obvykle 50–60 kDa. Optimální pH pro aktivitu komerčně produkovaných enzymů se pohybuje v oblasti mezi pH 6–7 [28, 29].

Trojrozměrná struktura je díky vysoce katalytické skupině schopna vázat se na substrát a štěpit glykosidové vazby. Dvojrozměrná struktura amylosového modelu je tvořena třemi

doménami A, B a C. Největší doména A představuje katalytické jádro z osmi β -barelých vláken. Na karboxylovém konci β -barelu se nachází prohlubeň ve tvaru V sloužící jako aktivní místo pro vazbu substrátu. Nejmenší doména B je tvořena smyčkou vycházející z domény A. Doména C má globulární charakter a je volně spojena s doménami A a B. Mezi doménami A a B se kromě aktivního místa nachází i vazebná místa pro vápenaté a chloridové ionty. Většina enzymových molekul vyžaduje přítomnost vápenatého iontu Ca^{2+} pro svou enzymovou aktivitu, strukturní soudržnost a teplotní stabilitu. Ionty totiž zabezpečují správnou konformaci aktivního místa [29, 30].



Obrázek 5: Struktura α -amylasy [31]

1.2.3 Glukoamylasy

Glukoamylasy, někdy označované jako amyloglukosidasy či γ -amylasy, jsou enzymy katalyzující hydrolýzu glykosidových vazeb od neredukujícího konce molekuly polysacharidu. Tyto exoproteiny tak postupně odštěpují samostatné glukosové jednotky z řetězce amylosy nebo amylopektinu. Na rozdíl od α -amylas štěpí i α -1,6-D-glykosidové vazby větvených polysacharidů, i když oproti α -1,4-D vazbám s nižší účinností a menší rychlostí. Produkty hydrolytického štěpení jsou β -D-glukosa, maltosa a limitní dextriny. Systematický název exoenzymu glukoamylasy je α -1,4-D-glukan-glukohydrolasa (EC 3. 2. 1. 3) [24, 29].

Je známo nejméně 23 primárních struktur glukoamylas lišících se svou velikostí, které mohou být získávány z různých zdrojů, především z plísní, kvasinek, eubacterií a archae. Průmyslově významné jsou především vláknité houby rodu *Aspergillus* a *Rhizopus* [32, 33, 34].

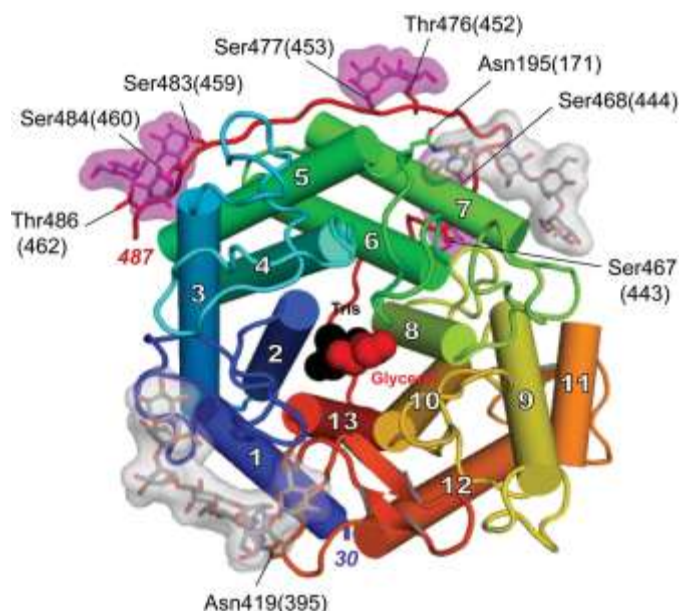
1.2.3.1 Molekulové vlastnosti glukoamylasy

Komerčně vyráběná glukoamylasa je značně termostabilní a vykazuje zvýšenou aktivitu při přibližně neutrálním pH. Molekulární hmotnost se pohybuje od 48 do 90 kDa podle zdroje enzymu, vyjma glukoamylasy získané z plísně rodu *Aspergillus*, která má 125 kDa [32, 35].

Molekula plísňové glukoamylasy se skládá ze dvou oblastí, z katalytické domény a domény vázající se na škrob. Katalytická doména je tvořena α -helixy stočenými do tvaru válce, který obklopuje aktivní místo ve tvaru trychtýře. Základ domény vázající se na škrob tvoří β -hřebeny stočené do válce. Na opačných koncích domény jsou dvě aktivní místa o zcela rozdílné struktuře interagující se škrobem a β -cyklodextriny. Domény jsou spojeny glykosylovaným polypeptidem [33].

Jsou známy dvě izoformy enzymu, označované jako G1 a G2. Isoformy vznikají ze stejné genové sekvence, ale sestřih zapříčiní vznik menší izoformy G2. Isoforma G1 se skládá z 640 aminokyselin a je tvořena katalytickou doménou, doménou vázající se na škrob a spojovací oblastí. Isoforma G2 na rozdíl od G1 postrádá doménu vázající se na škrob [32].

Doména vázající se na škrob má zásadní úlohu při hydrolýze škrobu, jelikož podporuje adsorpci enzymu na stěnu buňky, kde zvýšení jeho koncentrace zapříčiní větší tok glukosy do buňky [35].



Obrázek 6: Struktura glukoamylasy [32]

1.2.4 Inhibitory amylas

Aktivita amylas může být negativně ovlivněna sloučeninami označovanými jako inhibitory. Různé druhy inhibitorů vykazují různou specifitu vůči amylasám z různých zdrojů. Amylasové inhibitory jsou převážně získávány z rostlin či mikroorganismů a lze je rozdělit na proteinové a neproteinové. Amylasy inhibují například nejrozličnější anorganické ionty, 2-deoxyglukosa, maltosa a kyselina citronová [29].

Vazba inhibitoru na enzym je přímo vodíkovými vazbami nebo přes vodíkové vazby zprostředkované molekulami vody. Vazba neproteinových inhibitorů, jako je například

sacharid akarbosa nebo cyklodextriny, je možná díky jejich cyklické struktuře, která je podobná správnému substrátu [36].

Pro medicínské aplikace jsou významné hlavně proteinové inhibitory, které fungují jako škrobové blokátory v lidském těle, čehož může být využito pro pacienty trpící diabetem. Dalším využitím je ochrana zemědělských plodin proti škůdcům a patogenům [29, 36].

1.2.5 Produkce amylas

Komerční α -amylasy jsou produkovány z příslušných mikroorganismů submerzní fermentací (SmF) nebo simultánní sacharifikací s fermentací (SSF). SmF je snadná na kontrolu pH, teploty, aerace a vlhkosti, ale oproti SSF se tolik nepodobá přirozenému prostředí mikroorganismu. Při produkci enzymů je důležitá optimalizace podmínek fermentace, přičemž musí být zohledněny vlastnosti produkovaných enzymů [25].

Komerční α -amylasa získávaná z bakterií *Bacillus amyloliquifaciens* a *Bacillus licheniformis* je produkována fermentací při 30–40 °C a pH 7 za využití sójové moučky a laktosy v médiu. α -Amylasy může být produkována také plísněmi *Aspergillus oryzae* a *Aspergillus niger* rostoucími na pšeničných otrubách. Glukoamylasa je průmyslově produkována plísněmi rodu *Aspergillus*, *Rhizopus* a *Endomyces*. Optimální teplota fermentace je 30–35 °C. Plísně rodu *Aspergillus* jsou kultivovány na médiu s vysokou koncentrací škrobu, který je ztekucen termostabilní α -amylasou sterilací. Hodnota pH klesne při fermentaci na hodnotu 3–4 [37].

1.2.6 Průmyslové využití amylas

Jakožto enzymy hydrolyzující škrob jsou amylasy využívány v mnoha průmyslových odvětvích. K dispozici je na trhu několik enzymatických přípravků od různých výrobců pro specifické využití [28].

Sladové a mikrobiální α -amylasy nachází široké uplatnění v pečárenském průmyslu. Pro moderní způsob pečení je běžné obohacování mouky o α -amylasy. Výsledkem je vyšší rychlost fermentace a snížení viskozity těsta, což se projeví na objemu a struktuře výrobku, ale i dodatečná tvorba cukrů, které zlepšují chuť a barvu kůrky chleba. Dodáním enzymů do těsta lze potlačit zvětrávání, které snižuje životnost pečárenských výrobků [28].

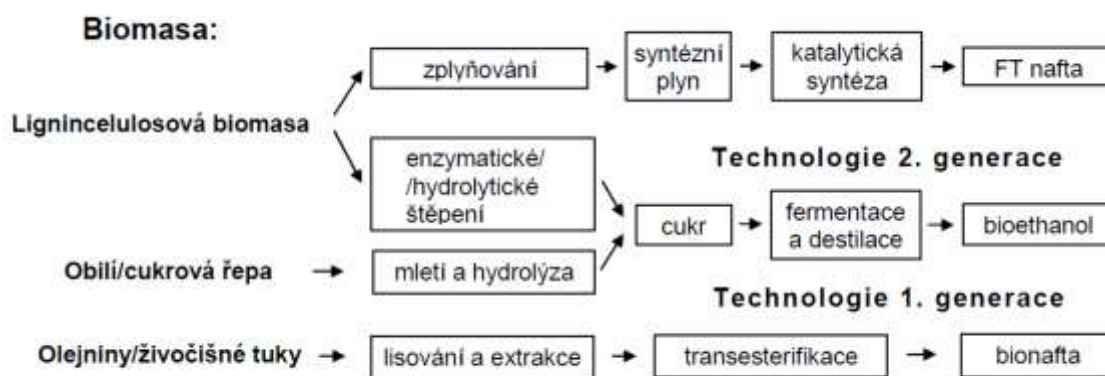
Největší využití amylas spočívá v produkci glukosy a fruktosy. Sirupy těchto hydrolyzátů škrobu jsou pro svou vysokou sladivost nezbytnou přísadou při výrobě různých sladkých nápojů. Sladivost sirupů škrobového původu závisí na stupni hydrolýzy. Pro kompletní konverzi škrobu na glukosu je prvním krokem jeho ztekucení na rozpustné dextriny při pH 6 a teplotě 95–105 °C. Pro tuto část se používají α -amylasy získané z bakterií rodu *Bacillus*. Dalším krokem je zcukření dextrinového sirupu na sirup o koncentraci glukosy více než 95 %. Tento krok je prováděn při pH 4,5 a teplotě 60–62 °C za použití glukoamylas získaných z plísní rodu *Aspergillus*. Třetím krokem může být přeměna glukosového sirupu na fruktosový enzymem izomerasou [27].

1.3 Výroba bioethanolu

1.3.1 Biopaliva

Biopaliva jsou obecně kapalné nebo plynné pohonné hmoty vyrobené z rostlinné hmoty, jako jsou zemědělské plodiny, komunální odpad nebo lesnický odpad. Studie prokázaly, že snižují emise uhlíku a mohly by přispět ke zvýšení energetické bezpečnosti. Biopaliva lze hrubě rozdělit na bionaftu a bioethanol [38].

Podle výchozí suroviny pro výrobu lze biopaliva rozdělit do tří generací. Biopaliva první generace, pro něž je výchozí surovinou biomasa, jsou primárně ze škrobnatých, cukernatých a olejnatých surovin. Biomasa pro paliva první generace je často produkována v tropických oblastech, kde vlivem nízkého ocenění životního prostředí může docházet k nahrazení přirozených ekosystémů bioenergetickými plodinami. Biopaliva druhé generace se liší druhem biomasy a svým vlivem na životní prostředí. Surovinou pro výrobu biopaliv druhé generace je lignocelulózová biomasa, která nemá potravinářské využití. Tato biopaliva mají v porovnání s fosilními biopalivy až 90% potenciál snížení oxidu uhličitého. Jako biopaliva třetí generace jsou označována biopaliva, která mají základ v biomase produkované řasami [39, 40].



Obrázek 7: Technologický postup výroby biopaliv první a druhé generace [39].

V souvislosti s problematikou globálního oteplování je snaha o snížení produkce skleníkových plynů, která je způsobena převážně spalováním fosilních paliv. Vhodnou alternativou jsou paliva získaná z obnovitelných zdrojů energie, z nichž je nejperspektivnější právě ethanol produkovaný z biomasy [2, 3].

Bioethanol má širší meze hořlavosti a vyšší výparné teplo než benzin. Oktanové číslo bioethanolu, veličina vyjadřující odolnost paliva proti samozápalu při kompresi, je přibližně 108. Nevýhodou je oproti benzínu o 40 % nižší výhřevnost, což zvyšuje spotřebu paliva. Nejčastěji je bioethanol využíván ve směsi s automobilovým benzinem [41].

Hlavním zdrojem bioethanolu jsou plodiny obsahující škrob či rovnou přímo jednoduché cukry nebo lignocelulózová biomasa. Největším producentem bioethanolu jsou Spojené státy americké, využívající jako výchozí surovinu převážně kukuřici. Největším vývozcem bioethanolu je Brazílie, jejíž výroba je zaměřena výhradně na cukrovou třtinu [2, 42].

1.3.2 Bioethanol ze škrobnatých surovin

Pro výrobu ethanolu má zásadní význam návrh výhodného procesu, výběr surovin a jim odpovídající přeměny na finální produkty. Bioethanol lze produkovat ze surovin přímo obsahujících zkvasitelné cukry nebo z polysacharidů, které je třeba nejprve hydrolyzovat. Mezi nejvíce využívané polysacharidy patří právě škrob obsažený v obilných zrnech [23].

Nejvíce využívanými surovinami pro výrobu bioethanolu jsou v Evropě kukuřice a pšenice. Nejprve musí být obiloviny mechanicky upraveny mletím nebo drcením. Dojde tak k odstranění slupek zrn a stébla a surovina se zpřístupní pro následnou aplikaci enzymů. Druhým krokem je příprava zápar, kdy dochází k bobtnání a mazovatění škrobových zrn. Škrob je působením enzymů hydrolyzován za vzniku glukosového sirupu. Následuje kvašení ve fermentoru, kdy je nutné dodržet pH a teplotu vhodné pro použité mikroorganismy. Dalším krokem je oddestilování bioethanolu a jeho přečištění [2, 43].

1.3.3 Bioethanol z lignocelulosových surovin

Jedním z hlavních problémů výroby ethanolu je dostupnost surovin, která se liší dle ročního období a klimatických podmínek. Výrobní cenu také ovlivňuje cena daných surovin. Lignocelulosa je atraktivní materiál pro výrobu bioethanolu z důvodu její hojnosti, vysokých výnosů, nízkých nákladů a nízké zátěže pro životní prostředí. Je to zajímavý obnovitelný zdroj energie, který nekonkuruje potravinářskému využití zemědělských plodin [2, 44, 45].

Do lignocelulosa biomasy lze zahrnout například zemědělský odpadní materiál, dřevo a dřevní odpad a papírový odpad. Lignocelulosa zaujímá zhruba 50 % světové biomasy a teoreticky by mohla produkovat až 492 miliard litrů bioethanolu ročně, což je šestnáctkrát více, než je současná světová produkce. Největší potenciál pro výrobu bioethanolu má rýžová sláma, která je světově nejhojnějším lignocelulosovým odpadním materiálem, a borovice, která má nejvyšší obsah celulosy a hemicelulosy [2, 3].

Výroba bioethanolu z lignocelulosa biomasy zahrnuje hydrolýzu celulosy a hemicelulosy, fermentaci, oddělení ligninových zbytků a nakonec přečištění ethanolu. Hydrolýza celulosy je náročná vzhledem k fyzikálně-chemickým a strukturním vlastnostem materiálu. Kvůli tomu je nezbytná předúprava materiálu sestávající z degradace struktury ligninu a narušení krystalické struktury celulosy za účelem lepší dostupnosti pro hydrolyzující enzymy [45].

1.3.4 Mikroorganismy produkující bioethanol

Rozvoj průmyslové výroby bioethanolu se potýká s nedostatkem mikroorganismů vhodných pro konverzi biomasy na bioethanol. Jelikož žádný z mikroorganismů není schopen fermentovat směs hexosy a pentosy, která je získávána hydrolýzou lignocelulosového materiálu, genové inženýrství se zabývá řešením tohoto problému. Rekombinanty schopné konvertovat lignocelulosové hydrolyzáty lze připravit dvěma způsoby. První způsob je vložení genů pro konverzi pentos do organismu, který je přirozeně schopen fermentovat pouze hexosy. K takovým mikroorganismům patří například *Zymomonas mobilis* nebo *Saccharomyces cerevisiae*. Druhým způsobem je vnesení genů pro produkci ethanolu do

organismů, které jsou schopny fermentovat velké množství sacharidů. K těmto mikroorganismům se řadí například *Escherichia coli* [46].

V oblasti vývoje vhodných rekombinantních kmenů kvasinek i bakterií stále probíhá intenzivní výzkum. Nejčastějším mikroorganismem využívaným pro produkci bioethanolu tak zůstávají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Mnoha studiím byly podrobeny i bakterie *Zymomonas mobilis*, které by mohly zmíněným kvasinkám konkurovat [4, 46].

Kromě výše zmíněných kvasinek a bakterií je i řada dalších mikroorganismů schopna produkovat ethanol ze sacharidových substrátů. Z kvasinek a vláknitých hub to jsou například rody *Kluyveromyces*, *Rhizopus*, *Aspergillus* a *Zygosaccharomyces*, z bakterií pak například *Clostridium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* a *Lactobacillus* [47].

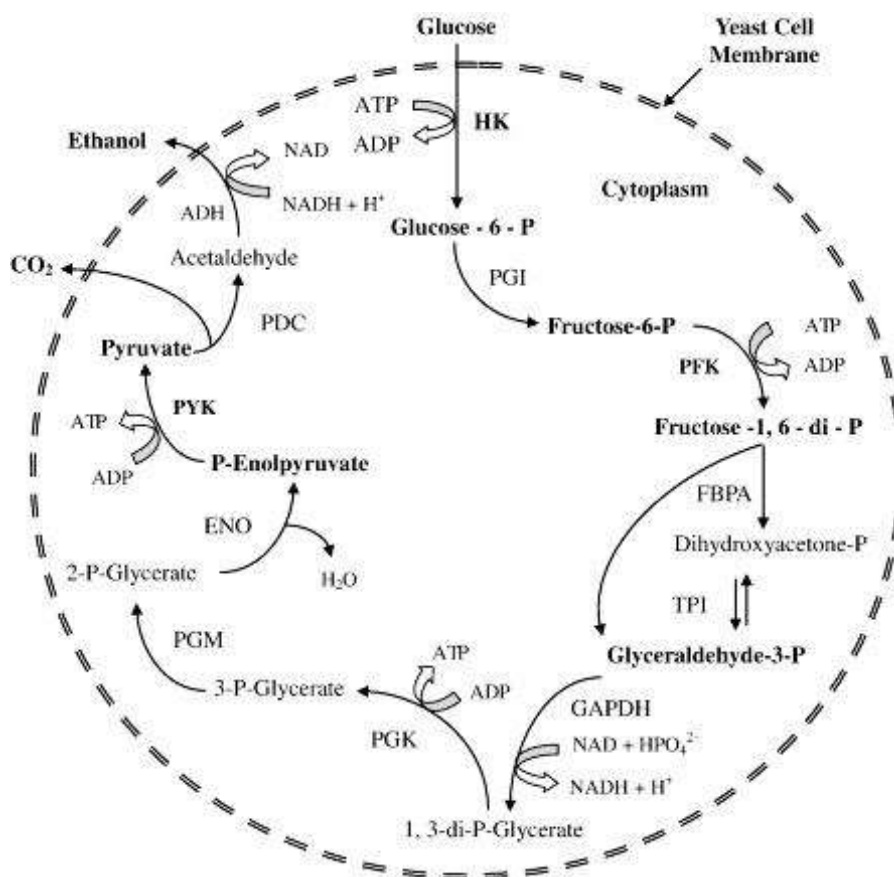
1.3.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patří taxonomicky do řádu *Endomycetales*. Tvar buněk je kulovitý nebo oválný. Rozmnožují se vegetativně multilaterálním pučením a nevytváří pravé mycelium. Askospory jsou kulovité až elipsoidní po 1 až 4 v asku a spájení je izogamní. Kvasinky zkvašují glukosu, sacharosu, maltosu, galaktosu a některé kmeny i trisacharid rafinosu [22, 46].

Saccharomyces cerevisiae jsou pro fermentační průmysl výhodné díky vysoké výtěžnosti ethanolu a vysoké toleranci vůči ethanolu a inhibitorům. Jakožto eukaryota s diferencovanými organelami však pomaleji rostou, což snižuje produkční rychlost a konverzi substrátu na ethanol [4, 46].

Rozhodující metabolickou drahou při alkoholovém kvašení je glykolýza, v níž je jedna molekula glukosy převedena přes fruktosu-1,6-bifosfát na glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyaceton. Po izomeraci dihydroxyacetonu jsou dvě molekuly pyruvátu v případě anaerobních podmínek redukovány na ethanol za uvolnění oxidu uhličitého. Při glykolýze vznikají dvě molekuly ATP, které jsou využity pro řadu energií vyžadujících reakcí, které jsou důležité pro biosyntézu buněk. Produkce ethanolu je tudíž spojena s růstem kvasinkových buněk. Kromě ethanolu a oxidu uhličitého dochází i ke vzniku některých vedlejších produktů, jako je glycerol, organické kyseliny a vyšší alkoholy, avšak v menším množství než zmíněné hlavní produkty [4, 48].

Teoretický výtěžek je 0,51 litru ethanolu a 0,489 litru oxidu uhličitého, ale praktický výtěžek se zanedbáním zbytkového cukru činí 90 až 93 % teoretické hodnoty [4].



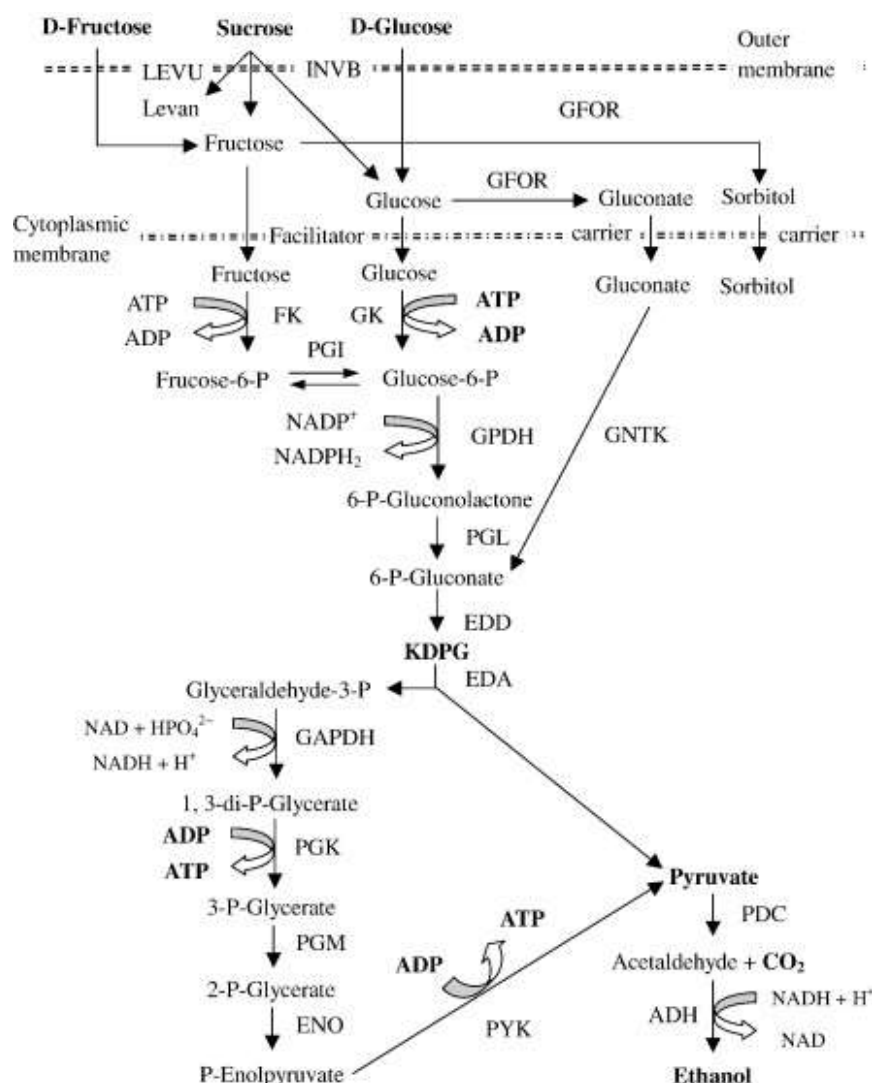
Obrázek 8: Metabolismus alkoholového kvašení kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [4].

1.3.4.2 *Zymomonas mobilis*

Zástupci rodu *Zymomonas* jsou gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie. Často jsou opatřeny 1 až 4 bičíky a nevytváří spory ani neukládají žádný rezervní materiál. Bakterie *Zymomonas mobilis* zkvašují glukosu, fruktosu a sacharosu za vzniku ethanolu, oxidu uhličitého a malého množství laktátu [4, 22].

Oproti kvasinkám jsou bakterie prokaryotické organismy, které nemají diferencované orgány, díky čemuž rostou rychleji a vyžadují méně živin pro produkci vlastní biomasy. Také rychlost produkce ethanolu výtežnost bakteriemi *Zymomonas mobilis* je v porovnání s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* až pětinašobně vyšší. Výtežnost ethanolu dosahuje až 97 % teoreticky vypočtené hodnoty, což je také více než u kvasinek [46].

Bakterie *Zymomonas mobilis* využívají pro alkoholové kvašení Entner-Doudoroffovu dráhu, kdy vzniká glyceraldehyd-3-fosfát a pyruvát rozštěpením 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonátu. Na jednu molekulu glukosy připadá výtěžek pouze jedné molekuly ATP, což má za následek menší vznik biomasy oproti kvasinkám [4, 48].



Obrázek 9: Metabolismus alkoholového kvašení bakterie *Zymomonas mobilis* [4].

1.4 Současný stav vědy v oblasti

Na základě stále se zvyšující industrializace a nárustu populace čelí svět vyčerpání energetických zdrojů získávaných z fosilních paliv. Těžba ropy je rychlejší, než je přirozená regenerace naší planety přes koloběh uhlíku a většina nalezišť ropy a zemního plynu se nachází pouze v malé skupině zemí světa. Spalováním fosilních paliv dochází k emisi skleníkových plynů, jako je oxid uhličitý, metan a oxid dusný, které mají nepříznivý vliv na klima planety Země. Východiskem jsou obnovitelné zdroje energie, které jsou rovnoměrněji rozložené než neobnovitelné zdroje a jsou šetrnější k životnímu prostředí. Jednou z možností je využití sluneční energie ve formě biomasy [49].

Nejvíce využívaným materiálem pro výrobu bioethanolu jsou v Evropě stále škrobnaté suroviny. Jejich spotřeba za tímto účelem se však projevuje v ceně potravin, které by mohly být z těchto surovin vyrobeny. Možností je i využití potravinářsky nevhodných částí rostlin označovaných jako lignocelulosový materiál. Jelikož předúprava lignocelulosového materiálu není úplně jednoduchá, hledají se i jiná řešení. Jedním z nich je zužitkování potravinového odpadu [5].

1.4.1 Potravinový odpad

Potravinový odpad je organický odpad produkovaný potravinářským průmyslem, restauracemi či domácnostmi. Podle organizace pro výživu a zemědělství je ročně vyhozeno 1,3 milionu tun jídla, což představuje jednu třetinu celosvětové produkce potravin určených jako zdroj energie a živin [50].

Chemické složení potravinového odpadu závisí na procentuálním zastoupení různých druhů potravin. V odpadu jsou zastoupeny polysacharidy, mezi něž patří škrob, celulóza a hemicelulóza, dále lignin, proteiny, lipidy, organické kyseliny a menší množství anorganických sloučenin. Celkový obsah sacharidů je 35,5–69 % [51].

Je řada možností, jak využít energii z potravinového odpadu. Jedním přístupem je zkrmování zbylých potravin hospodářskými zvířaty pro uzavření smyčky živin. Další možností je využití potravinového substrátu pro mikroorganismy a produkci například methanu, vodíku, ethanolu a enzymů. V tomto případě je potřeba obnovit takové složky bioodpadu, které budou schopny kultivované mikroorganismy využít a produkovat tak primární a sekundární metabolity [51, 52].

Při konverzi potravinového odpadu na bioethanol pomocí enzymatické hydrolýzy nemusí být vždy zapotřebí radikální předúprava materiálu, ale často je doporučována sterilizace. Je však potřeba vzít v potaz, že tepelná úprava může vést k částečné degradaci některých nutričních komponent a vedlejším reakcím jako je například Maillardova reakce. Bylo zjištěno, že použití čerstvého a mokrého potravinového odpadu je efektivnější oproti usušenému, jelikož při sušení se zmenšuje specifický povrch, se kterým mohou interagovat enzymy. Pokud tedy není materiál mikrobiálně kontaminován, je preferováno vypustit sušení. Mikrobiální kontaminaci a hnití se dá zabránit kyselými podmínkami [51].

1.4.2 Odpadní pečivo

Jedním z nejslibnějších potravinových odpadů je odpadní pečivo, respektive chléb. Jelikož jsou pekařské výrobky produkovány v přebytku pro uspokojení poptávky zákazníků, část pečiva zůstane na pultech obchodů neprodána a vrací se zpět do pekárny. Pekárny mají jen omezené množství možností, jak naložit s odpadním pečivem. Část může být zpracována na strouhanku a část použita jako krmivo pro hospodářská zvířata. Nicméně vzhledem k časté mikrobiální kontaminaci je využití odpadního pečiva jako složky potravy pro lidi i zvířata nemožné. Odpadní pečivo tak většinou končí na skládkách. Lepším řešením je využití odpadního pečiva pro výrobu bioethanolu. Studie dokazují, že výtežnost fermentace není zanedbatelná [5].

Chléb, jakožto výrobek z pšeničné a žitné mouky, obsahuje značné množství škrobu, který lze hydrolyzovat a následně využít k fermentaci na ethanol. Celkový obsah škrobu v chlebu je přibližně 500–750 g na jeden kilogram hmoty, jednoduchých cukrů pak 3–50 g. Chléb také obsahuje v jednom kilogramu hmoty 100–150 g proteinů, které po hydrolýze na aminokyseliny představují zdroj živin pro růst a metabolismus mikroorganismů [5].

I přesto, že chemické složení chleba je téměř stejné jako složení mouky, ze které je upečen, proces hydrolýzy a fermentace těchto dvou surovin se může lišit. Je to dáno tím, že během pečení chleba dojde k určitým strukturním změnám v molekule škrobu. Část škrobu zmazováte a část je depolymerována nativními enzymy z mouky, což usnadňuje následnou

hydrolýzu. Na druhou stranu některé části polysacharidového řetězce mohou být chráněny sítí lepku, která se v těstě vytvoří. Během pečení také dochází k Maillardově reakci redukujících sacharidů s aminokyselinami [53, 54].

Výtěžnost ethanolu z odpadního chleba, který nevykazuje známky napadení plísní, byla v závislosti na uspořádání experimentu 350–370 g na kilogram sušiny. Byla zkoumána i produkce ethanolu z plísní kontaminovaného chleba, přičemž výtěžnost byla 230–250 g na kilogram sušiny [5].

Byly provedeny i studie na využití odpadního pečiva jakožto výchozího materiálu pro produkci mléčné kyseliny, amylas a proteas pomocí plísně *Aspergillus awamori*, biovodíku pomocí bakterie *Arctinobacillus succinogenes* nebo aromatických sloučenin za pomoci plísně *Geotrichum candidum* [5, 54].

1.4.3 Netradiční škrobnaté suroviny

Kromě tradičních škrobnatých surovin, jako je pšenice a kukuřice, může být ethanol vyráběn i ze žita, ječmene, čiroku nebo triticales, což je plodina vzniklá zkřížením pšenice a žita. Velice slibnou surovinou je čirok, který má zrna s vysokým obsahem škrobu, stonky s vysokým obsahem sacharosy a na lignocelulosu bohaté listy. Tato plodina může být pěstována v mírném i tropickém podnebném pásu a je tolerantní vůči suchu a záplavám. Výzkumu bylo podrobeno i využití ságovníku, banánů a odpadu z nich [3].

V tropických zemích se těší velkému zájmu maniok. Tato hlíznatá plodina je snadno dostupná, a proto je využívána nejen pro výrobu bioethanolu, ale i glukosového sirupu. Při výrobě lze využít celé hlízy nebo z nich extrahovaný škrob. Maniok obsahuje 85–90 % škrobu v sušině a malé množství proteinů a minerálních látek. Maniokový škrob má nižší teplotu želatinace a vykazuje vyšší rozpustnost amylasami v porovnání s kukuřičným škrobem [3].

1.4.4 Trendy ve využití lignocelulosového odpadu

Hydrolýza lignocelulosového komplexu na zkvasitelné sacharidy je stále technicky problematická kvůli nepřístupnosti celulosy, a proto je nezbytná předúprava materiálu. Současný výzkum se zaměřuje na hledání způsobu, jak snížit množství enzymů při následné enzymatické hydrolýze celulosy a snížit její čas. Pro širokou škálu materiálů byla navržena řada přístupů zahrnujících fyzikální, fyzikálně-chemické, chemické i biologické procesy [45].

K fyzikální předúpravě patří sekání, broušení a mletí snižující krystalinitu celulosy a zvětšující povrch materiálu. Více efektivní jsou fyzikálně-chemické metody, z nichž je nejvíce prostudována exploze nasycenou vodní parou za vysokého tlaku vedoucí k autohydrolýze části hemicelulosy a ligninu na oligomery. Dalšími fyzikálně-chemickými metodami jsou exploze amoniakem nebo oxidem uhličitým. Chemické metody využívají různá chemická činidla, pro předúpravu biomasy je preferována kyselina sírová a chlorovodíková. Alkalická předúprava je založena na přidání zředěné báze k biomase, přičemž efektivnost závisí na obsahu ligninu a tato metoda není příliš využívána ve velkém měřítku. Biologická předúprava má nízké energetické nároky a je šetrná k životnímu prostředí, ale většina možných procesů je příliš pomalá na využití v průmyslu. Degradace ligninu v biomase byla zkoumána za využití plísně *Phanerochaete chrysosporium* [3].

Jedním z největších problémů při předúpravě biomasy je rozdílný obsah ligninu a hemicelulosity, což vede k nutnosti aplikace různých metod předúprav pro různé suroviny. Vývoj metod pro předúpravu závisí na rozšiřování produkce geneticky modifikovaných rostlinných materiálů s vyšším podílem sacharidické složky nebo modifikovanou strukturou usnadňující předúpravu za mírnějších podmínek [3].

Hydrolyza lignocelulosového materiálu je v současné době prováděna mikrobiálními celulólytickými enzymy namísto zředěných kyselin. Kyselá hydrolyza vyžaduje vysoké teploty a zároveň vzniká degradací xylosy furfural a další sloučeniny. Jednou z variant kyselé hydrolyzy je použití velmi slabé kyseliny a vysokých teplot, což bylo vyzkoušeno při získávání ethanolu z pilin. Nicméně enzymatická hydrolyza je výhodnější pro následnou fermentaci, protože nedochází k degradaci glukosy. Většina komerčních celulas je získávána z plísň *Trichoderma reesei*, popřípadně z *Aspergillus niger* [3].

Fermentace cukrů získaných po hydrolyze biomasy je dalším důležitým krokem, kde je zapotřebí množství technických vylepšení. Ideální fermentující mikroorganismus by měl vykazovat vysokou výtěžnost ethanolu, využívat širokou škálu substrátů, tady hexosy i pentosy, a být resistentní vůči inhibitorům vznikajících během hydrolyzy a fermentace, snášet vysoké koncentrace cukru a alkoholu, vysoké teploty a nízké hodnoty pH. Bohužel žádný ze známých mikroorganismů nesplňuje všechny tyto požadavky, vyvinutí takového mikroorganismu by tedy bylo velmi výhodné [55].

1.4.5 Geneticky modifikované mikroorganismy

Pro bioethanolový průmysl by se potenciálně kromě tradičních bakterií *Zymomonas mobilis* daly využívat i gramnegativní bakterie *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* a některé druhy rodu *Erwinia*, které mají přirozenou schopnost zkvašovat široké spektrum sacharidů, byť nemají vlastní enzymy pro syntézu ethanolu. Kmeny těchto druhů se upravují metodami genového inženýrství vložením takzvaného PET operonu. Na přípravou rekombinantního kmene termofilních bakterií *Bacillus megaterium* se zaměřily experimenty metabolického inženýrství, kdy tyto bakterie obohatily o geny kódující pyruvátdekarboxylázu z bakterií *Sarcina ventriculi* a alkoholdehydrogenázu z *Geobacillus stearothermophilus*, což jsou enzymy nezbytné pro produkci ethanolu. Dalším z perspektivních mikroorganismů upravených pomocí metod genového inženýrství je obligátně anaerobní bakterie *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* [46].

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* neumí zkvašovat pentózy xylosu a arabinosu, které vznikají hydrolyzou hemicelulosity, proto se genové inženýrství zabývá přípravou kmenů majících tuto vlastnost. Mezi kvasinky fermentující xylosu patří *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* a *Pachysolen tannophilus*, které však nejsou dostatečně tolerantní vůči ethanolu a inhibitorům vznikajících při předúpravě lignocelulosového materiálu. Proto byly při nedávných experimentech připraveny rekombinantní kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* vložením genetického materiálu z anaerobních hub rodu *Piromyces*, bakterií *Thermus thermophilus* nebo kvasinek *Pichia stipitis* [46].

1.4.6 Fermentace glycerolu

Vedle experimentů zabývajících se produkcí bioethanolu ze škrobnatého, sacharosového a lignocelulosového materiálu byl navržen i způsob produkce bioethanolu z glycerolu, jakožto odpadního produktu při výrobě bionafty esterifikací a transesterifikací rostlinných olejů. Vzhledem k současné rostoucí produkci a komercializaci bionafty roste i množství glycerolu, který je produkován v množství 10 hm. % na celkové množství bionafty. Čistý glycerol je využíván ve farmaceutickém, potravinářském či kosmetickém průmyslu, ale rafinace surového glycerolu získaného při výrobě bionafty je drahá, a proto jsou hledány alternativní způsoby jeho využití. Jednou z možností je jeho biokonverze na látky s přidanou hodnotou pomocí mikrobiální fermentace jako je například ethanol, butanol a mléčná, octová, máselná či propionová kyselina [56].

Ačkoliv je známa řada mikroorganismů, která je schopna metabolizovat glycerol, jen málo je schopných ho fermentovat. K takovým patří například enterobakterie rodů *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* či *Clostridium*. Fermentace glycerolu enterobakteriemi má obvykle za následek akumulaci dvou hlavních produktů, acetátu a 1,3-propandiolu, a řady vedlejších produktů, mezi nimiž je i ethanol, v závislosti na kultivačních podmínkách. Bylo však prokázáno, že při fermentaci glycerolu bakteriemi *Klebsiella planticola* izolovanými z jeleního batoru jsou hlavními produkty formiát a ethanol. Vysokých výnosů ethanolu bylo dosaženo také při fermentaci za anaerobních podmínek bakteriemi *Escherichia coli* nebo za použití geneticky upravených bakterií *Enterobacter aerogenes* [56].

1.4.7 Biopaliva třetí generace

Řasy jsou vodní fotosyntetizující mikroorganismy žijící jak ve slané, tak i ve sladké vodě. Světelnou energii využívají k syntéze buněk z oxidu uhličitého a vodíku z vody, patří k největším producentům kyslíku na Zemi. Za nepřítomnosti slunečního záření jsou schopny získávat energii oxidací organických sloučenin [22].

Sloučeniny produkované řasami přeměnou světla a oxidu uhličitého nacházejí řadu uplatnění v chemickém a farmaceutickém průmyslu, kosmetice a výživových doplncích. Mikroskopické jednobuněčné řasy, například druhy *Botryococcus* a *Chlorella*, ve svých buňkách akumulují hlavně lipidy, což je vhodné pro produkci bionafty. Makroskopické mnohobuněčné řasy a kyanobakterie, například rody *Chlamydomonas* nebo *Spirula*, oproti tomu akumulují převážně sacharidy, ze kterých může být fermentací vyráběn bioethanol. Kromě bionafty a bioethanolu mohou být řasy využity i pro výrobu biovodíku, což je další z obnovitelných zdrojů energie využívaný jako palivo [40].

Řasy jsou schopny zdvojnásobit během 2–5 dní svůj objem, což je výhodná vlastnost v porovnání s ostatními surovinami využívanými pro výrobu bioethanolu. Omezujícím faktorem komerčního využití je jejich kultivace. Podmínky kultivace musí být uzpůsobeny nárokům jednotlivých druhů a kmenů, které se liší v rychlosti růstu, produktivitě, efektivitě fotosyntézy, požadavkům na živiny a schopnosti reagovat na nepříznivé podmínky. Řasy lze kultivovat v otevřených nádržích, které nevyžadují vysoké vstupní náklady, ale výtěžnost biomasy je nízký. Druhou možností je kultivace v uzavřených bioreaktorech nebo hybridních systémech o vysokých vstupních nákladech, ale i vysoké výtěžnosti. Je tedy třeba najít kompromis mezi těmito dvěma veličinami [40].

Mechanismus fotosyntézy je podobný mechanismu vyšších rostlin, ale mikrořasy jsou efektivnější z důvodu jejich jednodušší struktury. Navíc z důvodu mikroskopické velikosti a růstu v kapalném médiu, živiny mohou být udržovány co nejbliž optimálních podmínek pro vysokou produktivitu. Některé druhy mikrořas mají schopnost produkovat velké množství sacharidů místo lipidů jakožto zásobních polymerů. Tyto druhy jsou ideálními kandidáty pro produkci bioethanolu. Odhaduje se, že produkce bioethanolu z jednoho hektaru mikrořas za rok by mohla být přibližně 46–140 litrů, což je o dost více oproti ostatním běžným surovinám. Slibnou mikrořasou je *Chlorella vulgaris*, která může akumulovat až 37 % škrobu v sušině [1].

Prvním krokem produkce bioethanolu za využití mikrořas je jejich kultivace za využití sluneční energie v otevřených nádržích nebo fotobioreaktorech. Dalším krokem je zakoncentrování biomasy a po sklizni extrakce škrobu z buněk mikrořas pomocí mechanického zařízení nebo enzymů. Následuje štěpení škrobu amylolytickými enzymy na zkvasitelné cukry a fermentace za využití kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* [57].

1.4.8 Perspektivy trhu ethanolu

Největší rozšíření ethanolového trhu se dá očekávat od Spojených států amerických, jelikož za poslední roky investovaly značné množství úsilí a finančních prostředků do výzkumu a rozvoje v dané oblasti. Vedle Spojených států amerických se dá očekávat expanze od Japonska, Evropy a Brazílie. Očekává se, že produkce ethanolu z celulosy bude v roce 2020 činit více než 62 miliard litrů. Na základě aktuálně navrhované a podepsané legislativy budou přes 63,9 % ethanolového obchodu zajímat Spojené státy americké, Evropa 10,4 % a Čína 11,5 % [1].

V současné době se nejvíce bioethanolu vyprodukuje z obilovin a cukrové třtiny, ale celosvětově jsou hledána nová řešení a technologie, které by měli příznivější energetickou bilanci a dopad na životní prostředí. Jednou z nejvýznamnějších alternativ je bioethanol z lignocelulosové biomasy, o kterém se uvažuje jako o hlavní surovině využívané v blízké budoucnosti ve velkém měřítku. Technologie na zpracování lignocelulosy jsou však stále ještě, na rozdíl od technologií na výrobu bioethanolu ze škrobu a sacharosy, ve fázi zdokonalování a navzdory značnému pokroku je třeba odstranit některé problémy. Za zmínku stojí například vysoké náklady na předúpravu biomasy, rychlost konverze a výtěžnost přeměny hemicelulosy na zkvasitelné cukry nebo otázka převodu technologie z vývoje do měřítek průmyslové výroby [1].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo srovnání vlivu předúprav a různých způsobů hydrolyz za účelem získání co nejvyššího výtěžku fermentovatelných sacharidů. Jakožto výchozí materiál bylo použito odpadní pečivo obsahující značný podíl škrobu, který byl rozštěpen na jednoduché sacharidy.

Experimentální práce byla inspirována prací W. Pietrzaka a J. Kawa-Rygielske a diplomovou prací Ing. Heleny Hudečkové [5, 58].

2.1 Použité chemikálie

2.1.1 Stanovení redukujících cukrů

- kyselina sírová 96% - p.a., Lach-Ner s.r.o., H_2SO_4
- uhličitan sodný bezvodý - PENTA, Na_2CO_3
- hydrogenuhličitan sodný - PENTA, NaHCO_3
- Seignettova sůl - p.a., Lach-Ner s.r.o., $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- síran sodný - p.a., Lach-Ner s.r.o., Na_2SO_4
- pentahydrát síranu měďnatého - p.a., Lach-Ner s.r.o., $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- molybdenan amonný tetrahydrát - MACH Chemikálie s.r.o., $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- heptahydrát hydrogenarseničnanu sodného - Sigma-Aldrich Co., $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- D-maltosa monohydrát - Carl Roth, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$
- D-glukóza bezvodá - p.a., PENTA, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- destilovaná voda, H_2O

2.1.2 Stanovení škrobu podle Ewerse

- kyselina chlorovodíková 35% - p.a., PENTA, HCl
- hexakynoželeznan draselný - p.a., Lachema,
- Síran zinečnatý - PENTA,

2.1.3 Chemická hydrolyza

- kyselina chlorovodíková 35% - p.a., PENTA, HCl
- kyselina sírová 96% - p.a., Lach-Ner s.r.o., H_2SO_4
- kyselina dusičná 65% - p.a., Lach-Ner s.r.o., HNO_3
- hydroxid sodný - čistý, PENTA, NaOH
- hydroxid draselný - čistý, Lachema, KOH

2.2 Materiál na hydrolyzu

- rohlíky tukové
- chleba konzumní pšenično-žitný

2.3 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy Pioneer™ OHAUS
- centrifuga Micro 120 Hettich
- elektrický vařič ETA dvouplotýnkový
- minitřepačka lab dancer vario IKA
- spektrofotometr Helios ε
- sušárna UM 500 Memmert
- temperovaná vodní lázeň
- sekáček potravin Hyundai CHO110, 300 W
- ultrazvuková čistička Ultrasound
- váhy elektronické Helago EK-300
- váhy elektronické OHAUS

2.4 Software

- Microsoft Word 2010, Microsoft Excel 2010

2.5 Příprava roztoků a vzorků

2.5.1 Příprava roztoků pro stanovení redukcí cukrů metodou Somogyi-Nelsona

Pro stanovení redukcí cukrů metodou Somogyi-Nelsona byly připraveny 3 reakční roztoky. Somogyiho roztok I byl přichystán navážením 24 g bezvodého Na_2CO_3 , 16 g NaHCO_3 , 12 g Seignettovy soli ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) a 144 g Na_2SO_4 . Navážky byly kvantitativně převedeny do kádinky, doplněny destilovanou vodou na 800 ml a řádně rozpuštěny. Somogyiho roztok II byl připraven navážením 4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ a 36 g bezvodého Na_2SO_4 . Jednotlivé navážky byly opět kvantitativně převedeny do kádinky, doplněny destilovanou vodou na 200 ml a rozpuštěny. Nelsonovo činidlo bylo nachystáno rozpuštěním 25 g molybdenanu amonného ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) ve 450 ml destilované vody. K roztoku bylo přidáno 21 ml H_2SO_4 a roztok vzniklý rozpuštěním 2,0 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ve 25 ml destilované vody. Všechny navážky byly provedeny s přesností na 0,01 g. Nelsonův roztok byl před použitím ponechán v termostatu 48 hodin při 37 °C. Během měření byly roztoky uchovávány v hnědých lahvích se zabroušeným hrdlem za nepřístupu světla [59].

2.5.2 Příprava roztoků pro stanovení škrobů podle Ewerse

Pro stanovení škrobů byl připraven roztok kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1,124 %. Dále byla namíchána 2 činidla pro číření podle Carezze. Jako Carezzovo činidlo I se používá 30% roztok síranu zinečnatého a jako Carezzovo činidlo II 15% hexakynoželeznatanu draselný. Při této metodě je využito čířícího účinku tvorbou sraženiny hexakynoželeznatanu draselného v cukerném roztoku. Kyselé prostředí zvyšuje účinnost číření [60].

2.5.3 Mletí pečiva

Kusy suchého pečiva rozkrájeného před sušením byly rozemlety pomocí elektrického sekáčku na malé částice. Pečivo bylo poté uchováváno v zásobní dóze při laboratorní teplotě.

2.5.4 Příprava vzorku

Základním vzorkem pro všechny prováděné experimenty byla 15% w/v suspenze rozemletého pečiva a vody. Do baňky o objemu 250 ml bylo naváženo 15 g namletého pečiva a přidáno 85 ml destilované vody.

2.6 Stanovení obsahu škrobu a vlhkosti vzorků

2.6.1 Stanovení obsahu škrobu podle Ewerse

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo s přesností na čtyři desetinná místa 5 g pomletého pečiva. Po přidání 50 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1,124 % byla baňka zahřívána na vroucí vodní lázni po dobu 15 minut. Poté bylo přidáno dalších 20 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové a obsah baňky byl vyčeřen 5 ml Carezzova činidla I a 5 ml Carezzova činidla II. Po doplnění baňky destilovanou vodou po značku a promíchání byl obsah zfiltrován. Optická rotace filtrátu byla změřena polarimetrem [60].

2.6.2 Stanovení vlhkosti vzorku

Do vysušené hliníkové misky byly naváženy s přesností na čtyři desetinná místa 3 g pomletého pečiva. Vzorky byly sušeny 90 minut v sušárně při 130 °C. Po vychladnutí v exsikátoru byl zvážením určen rozdíl hmotnosti [60].

2.7 Hydrolýzy

2.7.1 Kyselá hydrolýza

Na kyselou hydrolýzu škrobu byla použita kyselina sírová, kyselina chlorovodíková a kyselina dusičná. S každou kyselinou byla provedena měření při koncentracích 1, 5 a 10 % w/v. Základní uspořádání experimentu tedy sestávalo z 9 baněk 15% w/v suspenze pečiva ve vodě. Experiment byl v tomto uspořádání proveden pro 100 °C, 50 °C a laboratorní teplotu.

Do připravené 15% w/v suspenze pečiva ve vodě bylo po odebrání vzorku, ve kterém byla stanovena počáteční koncentrace redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona, přidáno odpovídající množství zásobní kyseliny tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace v celé suspenzi. Následně byly baňky se suspenzí vloženy na 60 minut do vodní lázně vytemperované na požadovanou teplotu. Po skončení hydrolýzy byl opět odebrán vzorek suspenze, ve kterém byla stanovena konečná koncentrace redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona (viz kapitola 2.8.1).

2.7.2 Alkalická hydrolýza

Na alkalickou hydrolýzu škrobu byl použit hydroxid sodný a hydroxid draselný. Pro každý hydroxid byly vybrány koncentrace 5, 10 a 15 % w/v. Základní uspořádání experimentu tedy stejně jako u kyselé hydrolýzy sestávalo z 9 baněk 15% w/v suspenze pečiva ve vodě. Experiment byl v tomto uspořádání proveden taktéž pro 100 °C, 50 °C a laboratorní teplotu.

Do připravené 15% w/v suspenze pečiva ve vodě bylo po odebrání vzorku, ve kterém se stanovila počáteční koncentrace redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona, přidáno odpovídající množství zásobního hydroxidu tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace

v celé suspenzi. Následně byly baňky se suspenzí vloženy na 60 minut do vodní lázně vytemperované na požadovanou teplotu. Po skončení hydrolýzy byl opět odebrán vzorek suspenze, ve kterém byla stanovena konečná koncentrace redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona (viz kapitola 2.8.1).

2.7.3 Hydrolýza ultrazvukem

Pro hydrolýzu ultrazvukem bylo využito ultrazvukové lázně. Z připravené 15% w/v suspenze pečiva ve vodě byl odebrán vzorek, ve kterém se stanovila počáteční koncentrace redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona, a baňka se suspenzí se ponechala v ultrazvuku po dobu 15 minut. Po skončení hydrolýzy byl opět odebrán vzorek suspenze, ve kterém byla stanovena konečná koncentrace redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona (viz kapitola 2.8.1).

2.7.4 Hydrolýza mikrovlnami

Pro hydrolýzu mikrovlnami bylo použito 3 stupňů výkonu mikrovlnné trouby odpovídajícím 385, 540 a 700 W. Pro každý stupeň výkonu byla použita doba hydrolýzy 2, 4 a 6 minut. Z připravené 15% w/v suspenze pečiva ve vodě byl odebrán vzorek, ve kterém se stanovila počáteční koncentrace redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona, a baňka se vložila do mikrovlnné trouby na daný čas při daném výkonu. Po skončení hydrolýzy byl opět odebrán vzorek suspenze, ve kterém byla stanovena konečná koncentrace redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona (viz kapitola 2.8.1).

2.8 Stanovení výtěžků hydrolýz

Výtěžky jednotlivých hydrolýz byly stanoveny metodou stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona.

2.8.1 Analýza metodou podle Somogyi-Nelsona

Do zkumavky byl vždy napipetován 1 ml standardního roztoku glukosy pro kalibraci nebo 1 ml vzorku po centrifugaci a zředění. Poté byl přidán 1 ml připravené směsi Somogyiho roztoků I a II (viz kapitola 2.5.1) smíchaných těsně před stanovením v poměru 4:1. Do zkumavky pro slepý vzorek byla pipetována destilovaná voda. Po důkladném promíchání byly zkumavky vloženy do vroucí vodní lázně na 15 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly přidány 2 ml Nelsonova činidla. Obsah zkumavek byl znovu promíchán a po 2 minutách doplněn destilovanou vodou na objem 10 ml. Roztok byl dokonale promíchán pomocí vortexu a pomocí spektrofotometru byla proměřena intenzita modrozeleného zbarvení proti slepému vzorku při 540 nm [59].

Pro standardní roztok glukosy byla sestrojena kalibrační křivka. Koncentrace redukujících sacharidů v odebraných vzorcích byly stanoveny výpočtem z rovnice lineární regrese. Každé měření bylo provedeno třikrát.

2.9 Statistické zpracování výsledků

Všechny získané hodnoty byly stanoveny třikrát. U těchto hodnot byl vypočítán průměr pomocí funkce PRŮMĚR, vždy pro tři měření, a hodnota intervalu spolehlivosti pomocí

funkce CONFIDENCE v programu Microsoft Excel 2010. Byla zvolena hladina statistické významnosti $\alpha = 0,05$.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Stanovení obsahu škrobu a vlhkosti ve vzorku

Ve zkoumaných vzorcích pečiva byl stanoven obsah škrobu a vlhkost. Pro stanovení obsahu škrobu byla využita metoda stanovení obsahu škrobu podle Ewerse (viz kapitola 2.6.1). Obsah škrobu ve vzorku chleba byl určen na $64,58 \pm 0,06 \%$ a ve vzorku rohlíků na $72,0 \pm 0,3 \%$.

Pro stanovení vlhkosti vzorku byla použita metoda stanovení vlhkosti ve vzorku (viz kapitola 2.6.2). Obsah vlhkosti ve vzorku chleba byl stanoven na $10,2 \pm 0,8 \%$ a ve vzorku rohlíků na $9,19 \pm 0,95 \%$.

3.2 Stanovení redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona

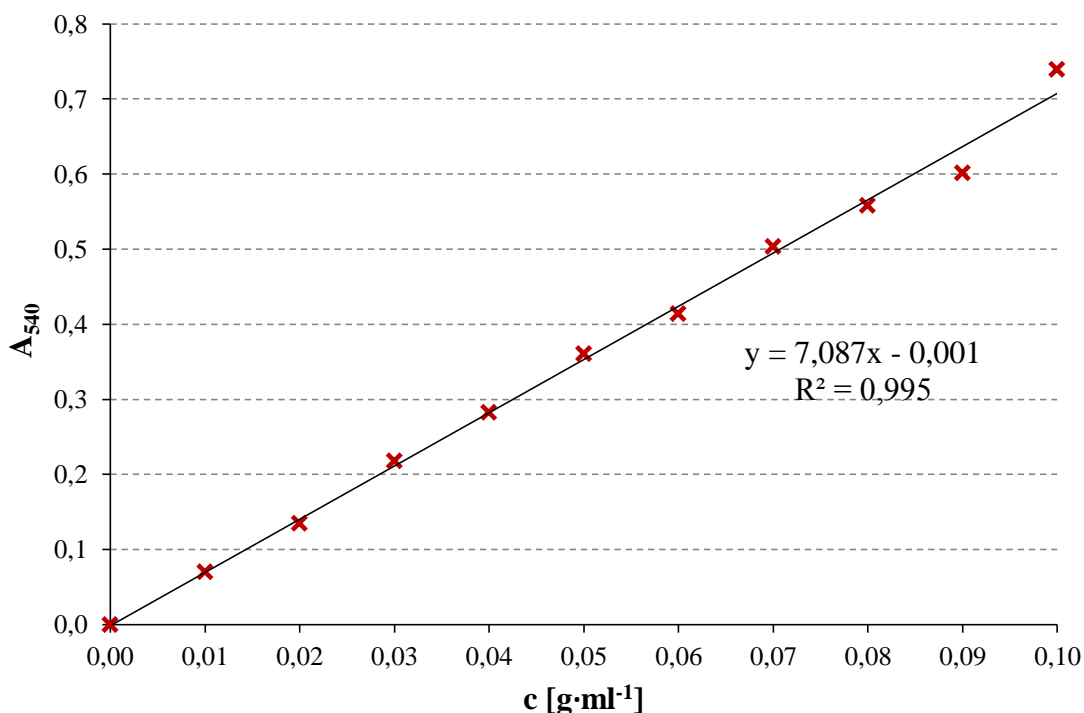
Stanovení redukujících cukrů bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 2.8.1. Ze standardního roztoku glukosy byly naředěny vzorky pro kalibraci a analyzovány spektrofotometricky. Následně byly stanoveny jednotlivé vzorky odebrané na počátku a na konci hydrolýzy. Stanovované vzorky byly před analýzou zředěny tak, aby odpovídaly rozsahu kalibrační křivky.

3.2.1 Kalibrační křivky

Tabulka 1: Kalibrační křivka glukosy

c [g·l ⁻¹]	A ₅₄₀
0	0
0,01	0,0700 ± 0,0009
0,02	0,1350 ± 0,0009
0,03	0,2177 ± 0,0005
0,04	0,2827 ± 0,0014
0,05	0,3610 ± 0,0019
0,06	0,4137 ± 0,0005
0,07	0,5030 ± 0,0040
0,08	0,5583 ± 0,0005
0,09	0,6017 ± 0,0014
0,10	0,7393 ± 0,0019

Graf 1: Kalibrační křivka glukosy



3.3 Chemické hydrolýzy

Byly provedeny hydrolýzy pomocí kyselin a hydroxidů za podmínek uvedených v kapitole 2.7.1 a 2.7.2. Pro stanovení stupně hydrolýzy byla použita analýza metodou podle Somogyi-Nelsona (viz kapitola 2.8.1), pomocí které bylo ve vzorcích odebraných před a po hydrolýze stanoveno množství redukujících cukrů. Pro výpočet koncentrace redukujících cukrů byla použita kalibrační křivka glukosy. Výsledky s intervaly spolehlivosti jsou znázorněny v tabulkách 2 až 9. Účinnost hydrolýz je vyjádřena jako změna koncentrace redukujících cukrů před a po hydrolýze v grafech 2 až 13. Vzhledem k tomu, že intervaly spolehlivosti nabývaly malé hodnoty, nebylo možné je znázornit v grafech jako chybové úsečky.

3.3.1 Chemická hydrolýza rohlíků

Tabulka 2: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů [g·l⁻¹] ve vzorcích rohlíků před hydrolýzou za použití různých koncentrací kyselin a teplot

teplota	koncentrace	H ₂ SO ₄	HNO ₃	HCl
100	1%	2,950 ± 0,015	4,37 ± 0,01	3,942 ± 0,013
	5%	3,49 ± 0,03	5,41 ± 0,02	4,14 ± 0,02
	10%	4,42 ± 0,03	4,97 ± 0,01	3,90 ± 0,05
50	1%	2,752 ± 0,008	3,61 ± 0,01	2,879 ± 0,008
	5%	3,100 ± 0,008	3,756 ± 0,007	2,620 ± 0,007
	10%	2,418 ± 0,013	2,623 ± 0,008	3,735 ± 0,007
laboratorní teplota	1%	4,283 ± 0,004	4,116 ± 0,007	3,297 ± 0,007
	5%	5,167 ± 0,004	3,886 ± 0,013	4,238 ± 0,013
	10%	3,57 ± 0,01	2,02 ± 0,02	4,737 ± 0,007

Tabulka 3: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] ve vzorcích rohlíků před hydrolyzou za použití různých koncentrací hydroxidů a teplot

teplota	koncentrace	NaOH	KOH
100	5%	$2,63 \pm 0,01$	$3,52 \pm 0,03$
	10%	$2,53 \pm 0,02$	$2,87 \pm 0,02$
	15%	$2,71 \pm 0,02$	$2,48 \pm 0,03$
50	5%	$4,424 \pm 0,004$	$4,47 \pm 0,01$
	10%	$4,67 \pm 0,01$	$2,303 \pm 0,007$
	15%	$2,909 \pm 0,007$	$4,21 \pm 0,01$
laboratorní teplota	5%	$3,66 \pm 0,02$	$4,126 \pm 0,013$
	10%	$4,156 \pm 0,008$	$4,083 \pm 0,013$
	15%	$4,08 \pm 0,02$	$2,916 \pm 0,007$

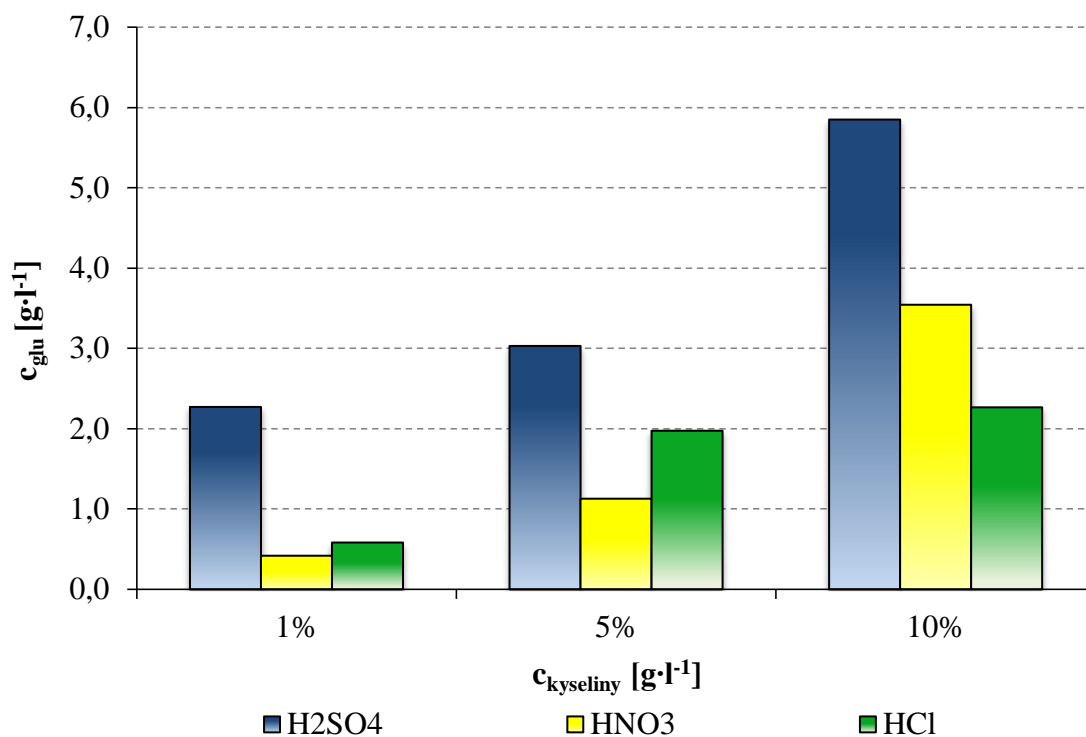
Tabulka 4: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] ve vzorcích rohlíků po hydrolyze za použití různých koncentrací kyselin a teplot

teplota	koncentrace	H_2SO_4	HNO_3	HCl
100	1%	$5,22 \pm 0,06$	$4,793 \pm 0,007$	$4,53 \pm 0,03$
	5%	$6,517 \pm 0,016$	$6,543 \pm 0,007$	$6,11 \pm 0,02$
	10%	$10,27 \pm 0,04$	$8,519 \pm 0,008$	$6,162 \pm 0,013$
50	1%	$2,968 \pm 0,004$	$4,05 \pm 0,02$	$3,328 \pm 0,014$
	5%	$4,024 \pm 0,007$	$4,681 \pm 0,008$	$3,23 \pm 0,02$
	10%	$3,949 \pm 0,004$	$4,215 \pm 0,008$	$4,42 \pm 0,03$
laboratorní teplota	1%	$4,56 \pm 0,02$	$4,48 \pm 0,03$	$3,533 \pm 0,013$
	5%	$5,56 \pm 0,02$	$4,400 \pm 0,014$	$4,567 \pm 0,007$
	10%	$4,224 \pm 0,013$	$4,363 \pm 0,007$	$5,123 \pm 0,008$

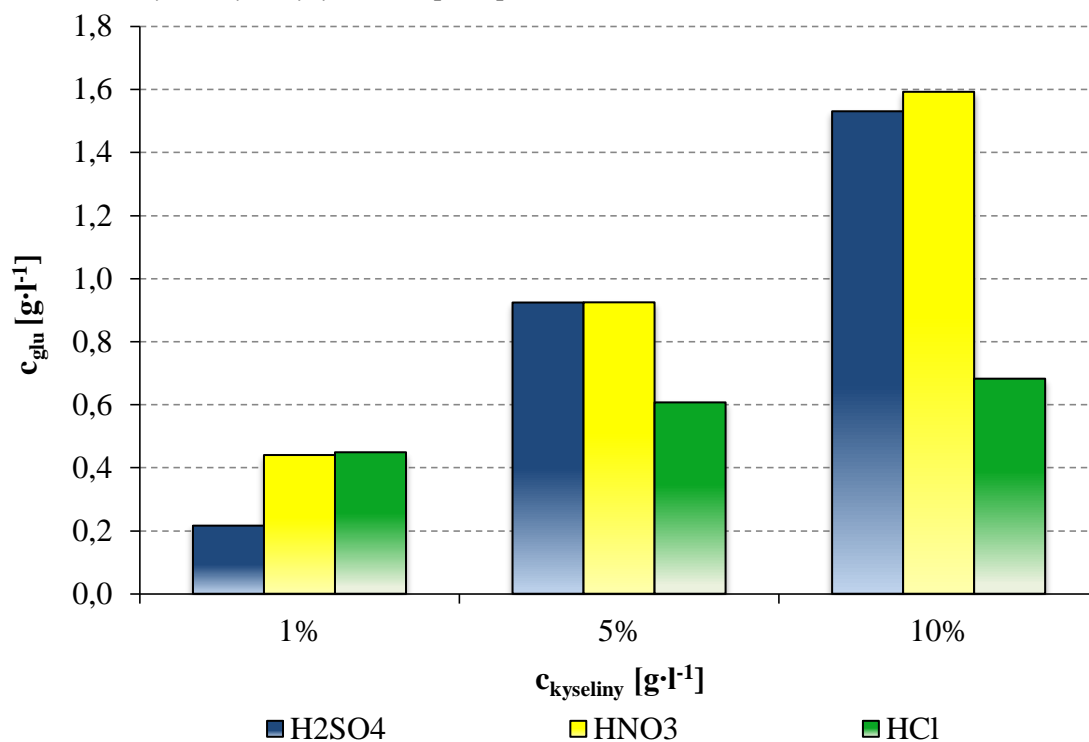
Tabulka 5: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] ve vzorcích rohlíků po hydrolyze za použití různých koncentrací hydroxidů a teplot

teplota	koncentrace	NaOH	KOH
100	5%	$3,110 \pm 0,013$	$5,118 \pm 0,007$
	10%	$3,759 \pm 0,013$	$5,48 \pm 0,02$
	15%	$4,40 \pm 0,03$	$5,216 \pm 0,007$
50	5%	$4,991 \pm 0,008$	$4,718 \pm 0,013$
	10%	$5,687 \pm 0,008$	$2,856 \pm 0,013$
	15%	$4,093 \pm 0,008$	$4,770 \pm 0,008$
laboratorní teplota	5%	$4,45 \pm 0,01$	$4,238 \pm 0,014$
	10%	$4,98 \pm 0,02$	$5,097 \pm 0,007$
	15%	$4,951 \pm 0,004$	$4,257 \pm 0,008$

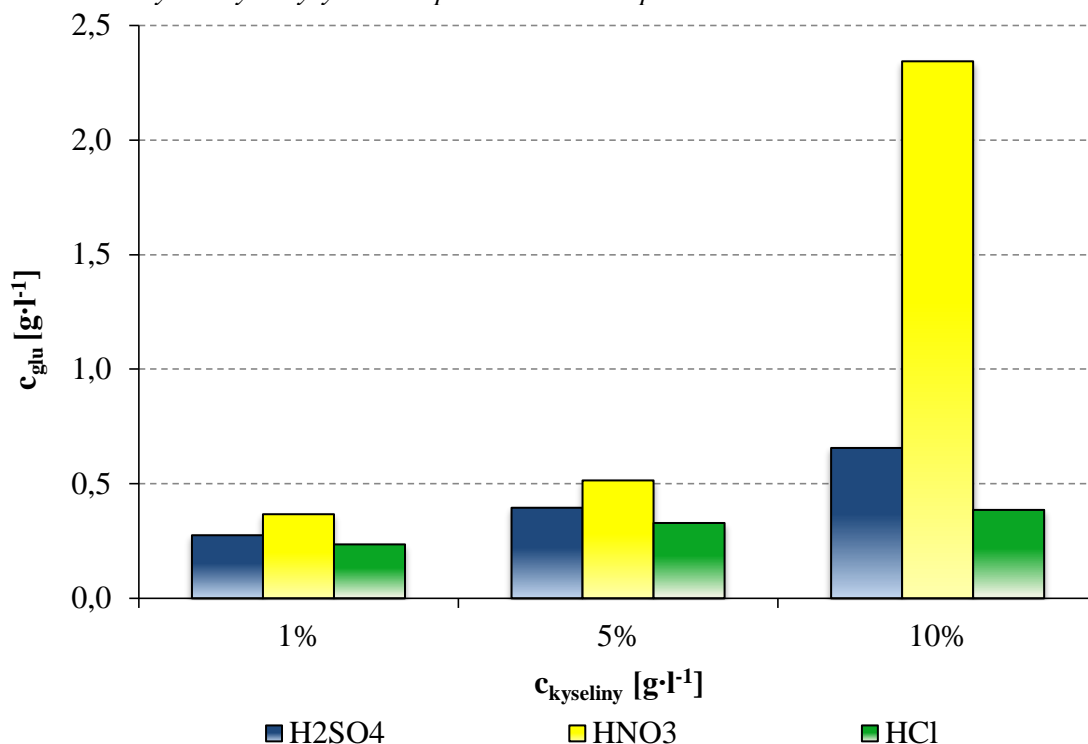
Graf 2: Účinnost kyselé hydrolyzy rohlíků při teplotě 100 °C



Graf 3: Účinnost kyselé hydrolyzy rohlíků při teplotě 50 °C

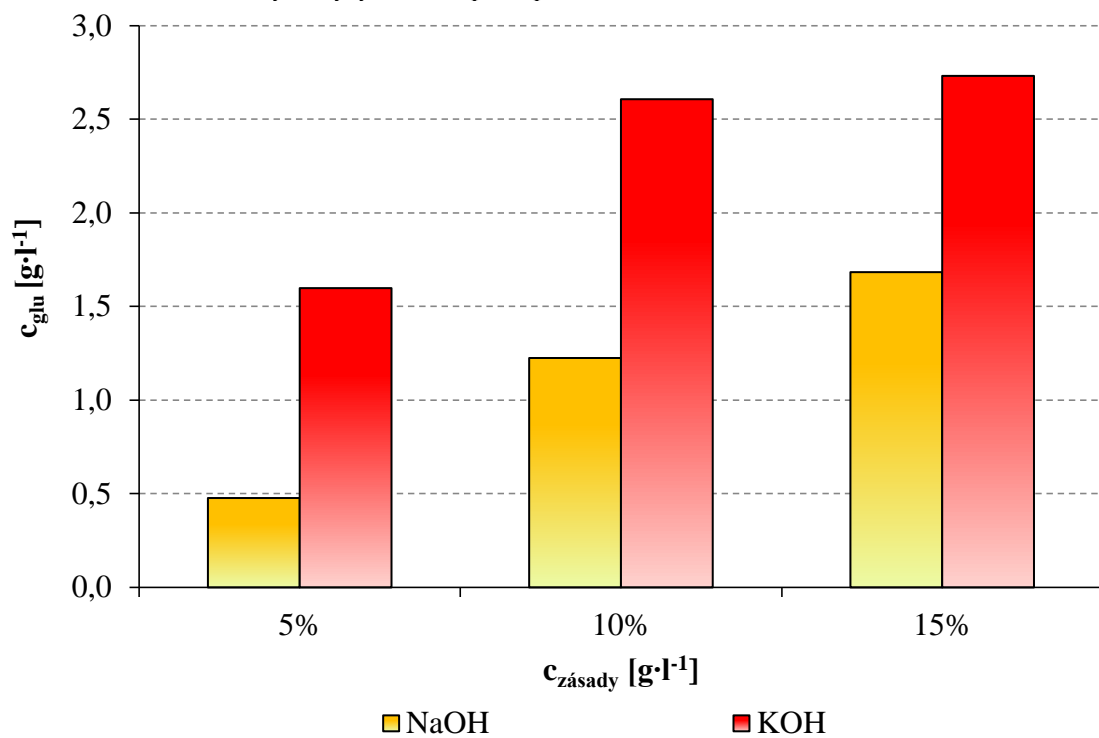


Graf 4: Účinnost kyselé hydrolyzy rohlíků při laboratorní teplotě

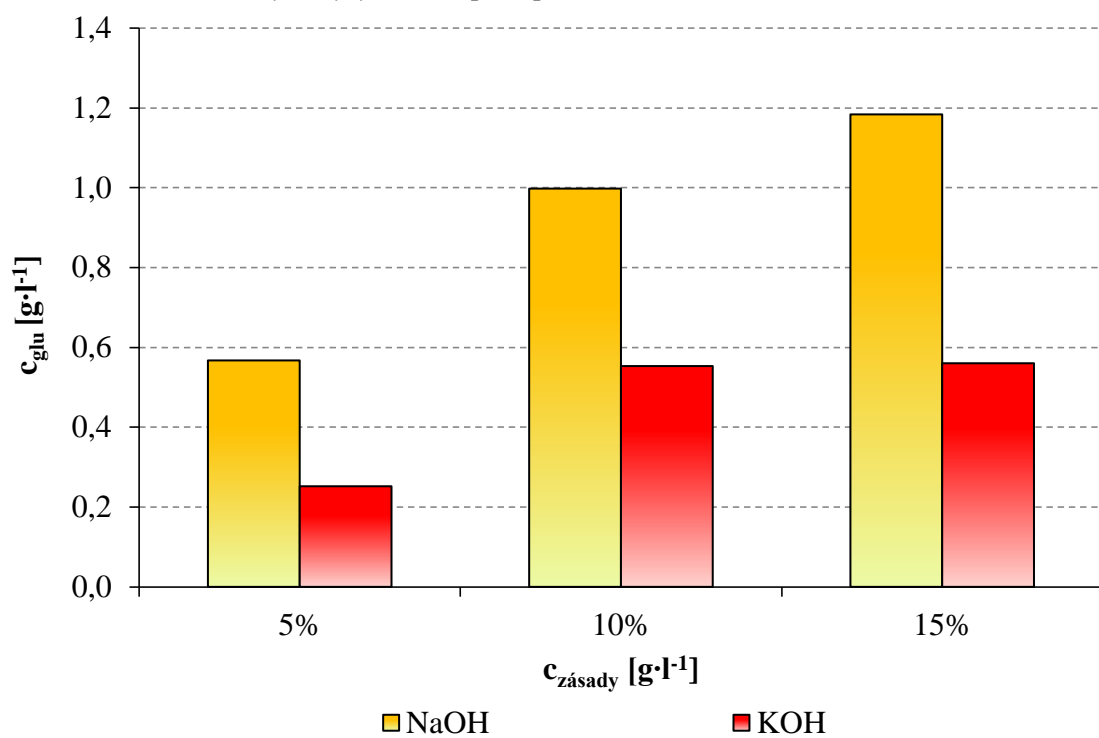


V grafech 2 až 4 je znázorněna účinnost hydrolyzy rohlíků za použití různých koncentrací kyselin při 3 různých teplotách. Z grafů je patrné, že největšího efektu hydrolyzy škrobu v rohlících bylo dosaženo při teplotě 100 °C za použití 10% kyseliny sírové. I zbylé koncentrace kyseliny sírové byly za této teploty efektivnější oproti ostatním použitým kyselinám. Při teplotě 50 °C byla nejúčinnější kyselina dusičná, ale hydrolyza pomocí kyseliny sírové byla téměř srovnatelná. Při laboratorní teplotě byla nejefektivnější hydrolyza kyselinou dusičnou při všech použitých koncentracích.

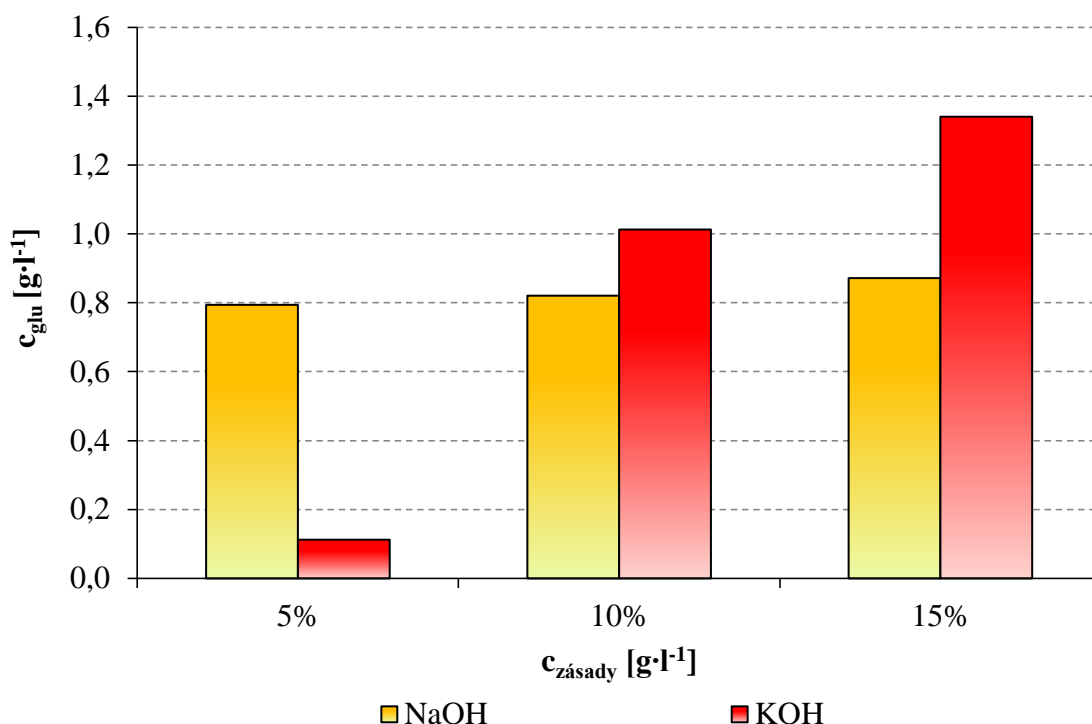
Graf 5: Účinnost alkalické hydrolýzy rohlíků při teplotě 100 °C



Graf 6: Účinnost alkalické hydrolýzy rohlíků při teplotě 50 °C



Graf 7: Účinnost alkalické hydrolýzy rohlíků při laboratorní teplotě



V grafech 5 až 7 je zobrazena účinnost hydrolýzy rohlíků za použití různých koncentrací hydroxidů při 3 různých teplotách. Z grafů je zřejmé, že největšího efektu hydrolýzy škrobu v rohlících bylo dosaženo při teplotě 100 °C za použití 15% hydroxidu draselného. I při dalších koncentracích byl za této teploty hydroxid draselný efektivnější oproti hydroxidu sodnému. Při teplotě 50 °C byl naopak účinnější hydroxid sodný. Při laboratorní teplotě byl za použití hydroxidu sodného stupeň hydrolýzy téměř stejný u všech koncentrací. Nejlepšího výsledku bylo u laboratorní teploty dosaženo použitím 15% hydroxidu draselného.

3.3.2 Chemická hydrolýza chleba

Tabulka 6: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[\text{g} \cdot \text{l}^{-1}]$ ve vzorcích chleba před hydrolýzou za použití různých koncentrací kyselin a teplot

teplota	koncentrace	H_2SO_4	HNO_3	HCl
100	1%	$4,520 \pm 0,004$	$4,494 \pm 0,004$	$4,158 \pm 0,007$
	5%	$3,413 \pm 0,004$	$3,669 \pm 0,004$	$3,794 \pm 0,004$
	10%	$4,045 \pm 0,007$	$4,09 \pm 0,02$	$4,066 \pm 0,007$
50	1%	$2,84 \pm 0,02$	$3,29 \pm 0,01$	$2,87 \pm 0,02$
	5%	$2,4 \pm 0,7$	$3,747 \pm 0,004$	$3,70 \pm 0,03$
	10%	$3,775 \pm 0,004$	$3,935 \pm 0,014$	$3,062 \pm 0,004$
laboratorní teplota	1%	$4,116 \pm 0,007$	$5,273 \pm 0,013$	$3,535 \pm 0,004$
	5%	$3,46 \pm 0,01$	$5,62 \pm 0,01$	$3,467 \pm 0,007$
	10%	$3,803 \pm 0,004$	$5,468 \pm 0,014$	$3,443 \pm 0,004$

Tabulka 7: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] ve vzorcích chleba před hydrolyzou za použití různých koncentrací hydroxidů a teplot

teplota	koncentrace	NaOH	KOH
100	5%	$2,691 \pm 0,008$	$4,17 \pm 0,01$
	10%	$3,956 \pm 0,013$	$4,40 \pm 0,01$
	15%	$4,339 \pm 0,004$	$4,118 \pm 0,008$
50	5%	$3,003 \pm 0,004$	$3,778 \pm 0,015$
	10%	$2,84 \pm 0,02$	$2,90 \pm 0,02$
	15%	$4,161 \pm 0,014$	$3,152 \pm 0,013$
laboratorní teplota	5%	$2,691 \pm 0,008$	$4,17 \pm 0,01$
	10%	$3,815 \pm 0,013$	$4,23 \pm 0,01$
	15%	$4,339 \pm 0,004$	$4,118 \pm 0,008$

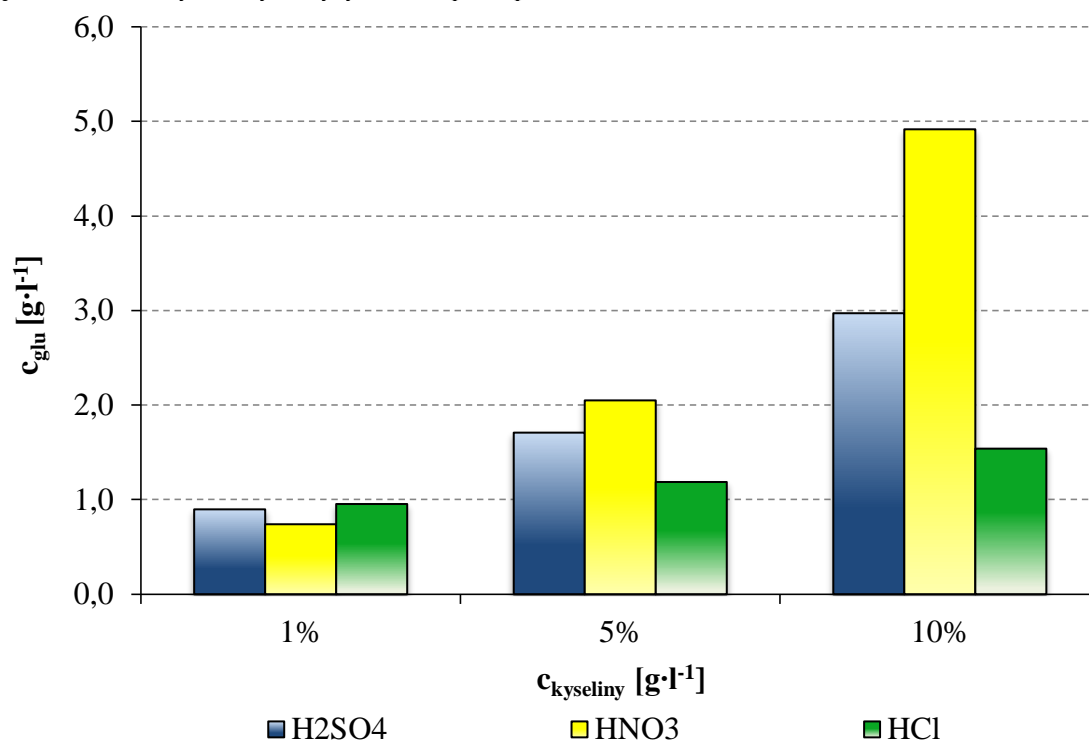
Tabulka 8: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] ve vzorcích chleba po hydrolyze za použití různých koncentrací kyselin a teplot

teplota	koncentrace	H_2SO_4	HNO_3	HCl
100	1%	$5,42 \pm 0,03$	$5,24 \pm 0,02$	$5,113 \pm 0,013$
	5%	$5,123 \pm 0,008$	$5,720 \pm 0,013$	$4,982 \pm 0,008$
	10%	$7,018 \pm 0,013$	$9,008 \pm 0,013$	$5,607 \pm 0,013$
50	1%	$3,777 \pm 0,007$	$4,812 \pm 0,008$	$3,968 \pm 0,017$
	5%	$3,328 \pm 0,004$	$5,6 \pm 0$	$4,935 \pm 0,008$
	10%	$5,41 \pm 0,08$	$6,64 \pm 0,03$	$4,60 \pm 0,02$
laboratorní teplota	1%	$4,304 \pm 0,008$	$5,40 \pm 0,03$	$3,606 \pm 0,004$
	5%	$4,01 \pm 0,03$	$5,79 \pm 0,03$	$3,798 \pm 0,013$
	10%	$4,535 \pm 0,013$	$5,72 \pm 0,02$	$3,843 \pm 0,004$

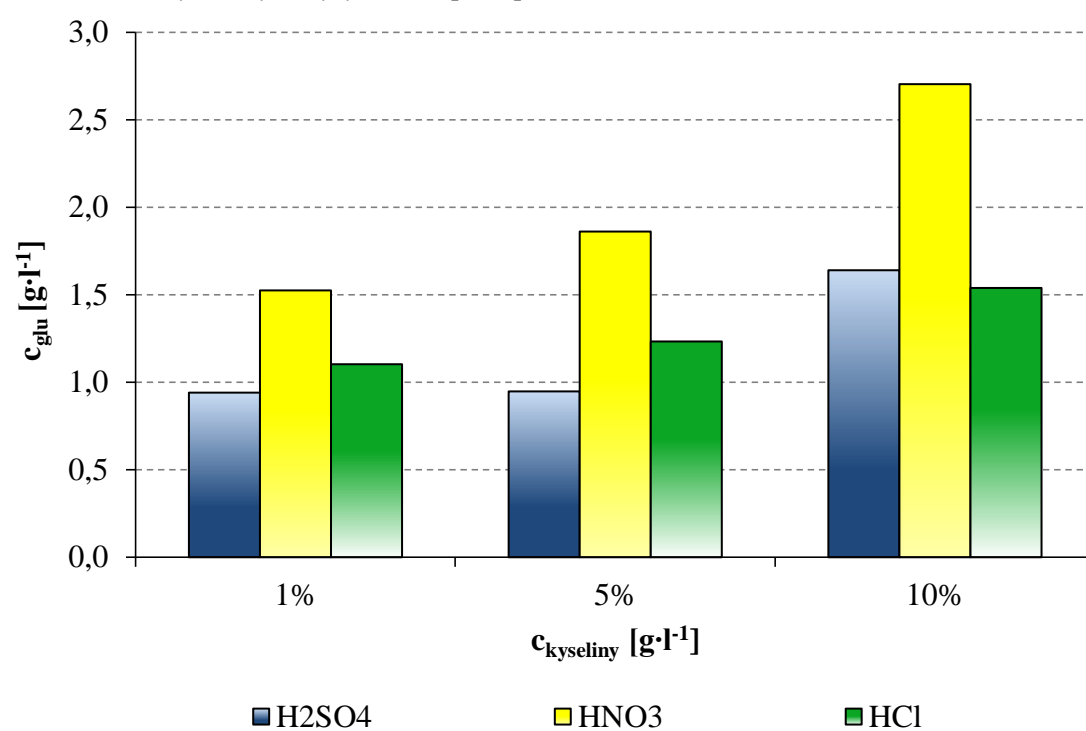
Tabulka 9: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] ve vzorcích chleba po hydrolyze za použití různých koncentrací hydroxidů a teplot

teplota	koncentrace	NaOH	KOH
100	5%	$3,170 \pm 0,007$	$4,286 \pm 0,015$
	10%	$4,523 \pm 0,004$	$4,74 \pm 0,02$
	15%	$5,03 \pm 0,02$	$4,47 \pm 0,03$
50	5%	$4,140 \pm 0,013$	$5,20 \pm 0,01$
	10%	$4,412 \pm 0,013$	$4,391 \pm 0,007$
	15%	$5,48 \pm 0,02$	$5,63 \pm 0,03$
laboratorní teplota	5%	$3,170 \pm 0,007$	$4,286 \pm 0,015$
	10%	$4,41 \pm 0,03$	$4,507 \pm 0,013$
	15%	$5,03 \pm 0,02$	$4,47 \pm 0,03$

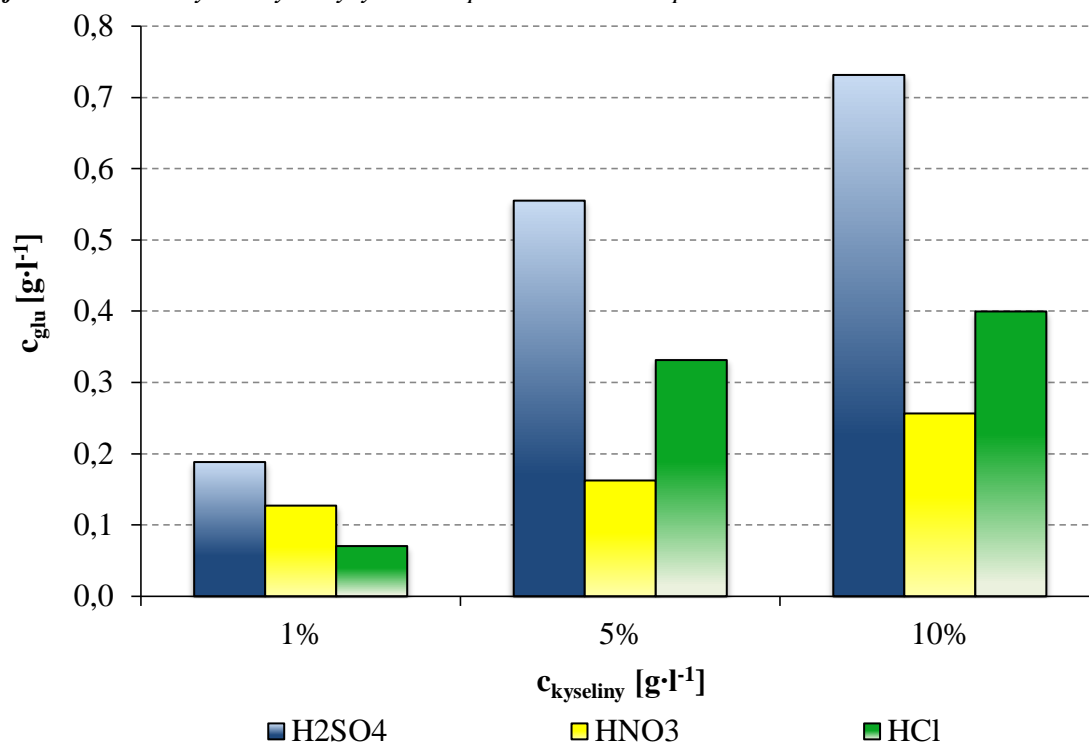
Graf 8: Účinnost kyselé hydrolyzy chleba při teplotě 100 °C



Graf 9: Účinnost kyselé hydrolyzy chleba při teplotě 50 °C

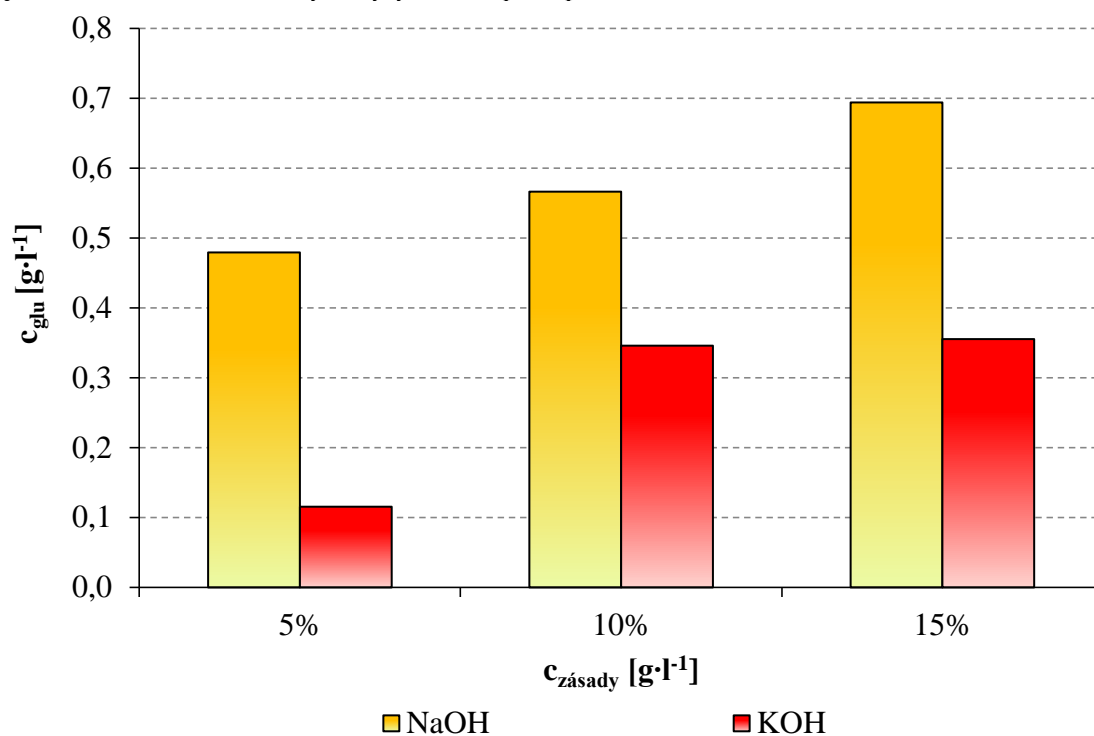


Graf 10: Účinnost kyselé hydrolýzy chleba při laboratorní teplotě

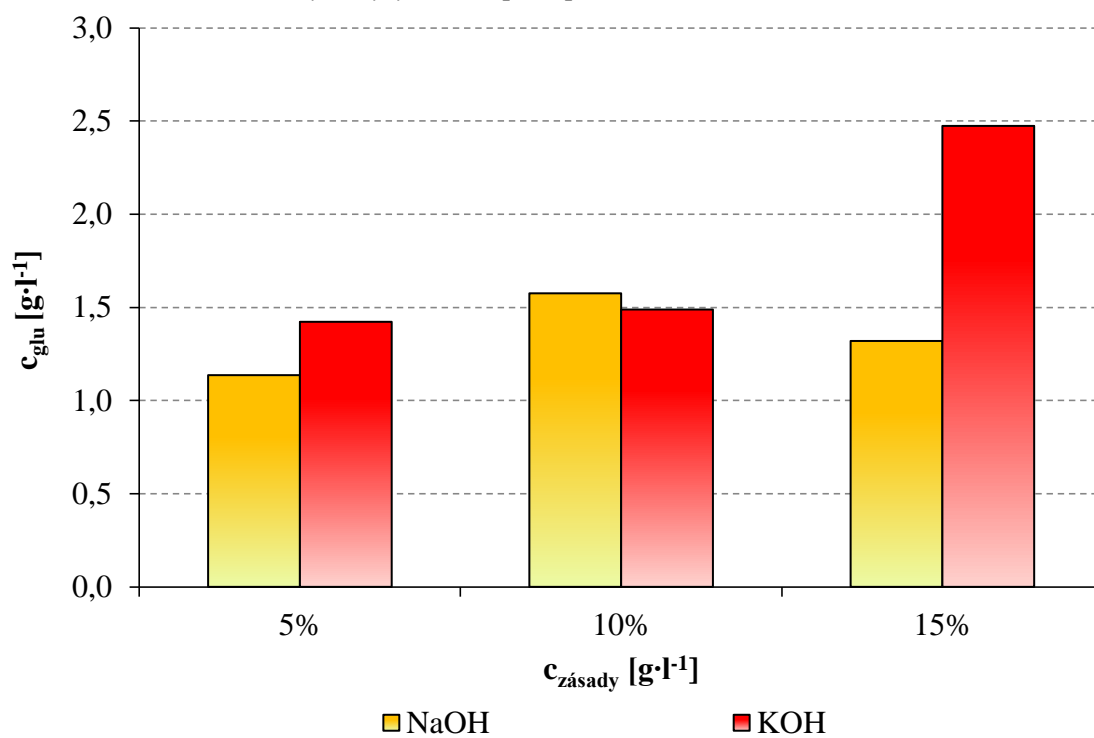


V grafech 8 až 10 je znázorněna účinnost hydrolýzy chleba za použití různých koncentrací kyselin při 3 různých teplotách. Z grafů je patrné, že největšího efektu hydrolýzy škrobu v chlebu bylo dosaženo při teplotě 100 °C použitím 10% kyseliny dusičné. Při teplotě 50 °C byla nejúčinnější kyselina dusičná. Při použití nejnižší koncentrace kyseliny dusičné byl efekt hydrolýzy podobný, jako při použití nejvyšších koncentrací zbylých kyselin. Za laboratorní teploty byla při všech použitých koncentracích nejefektivnější kyselina sírová.

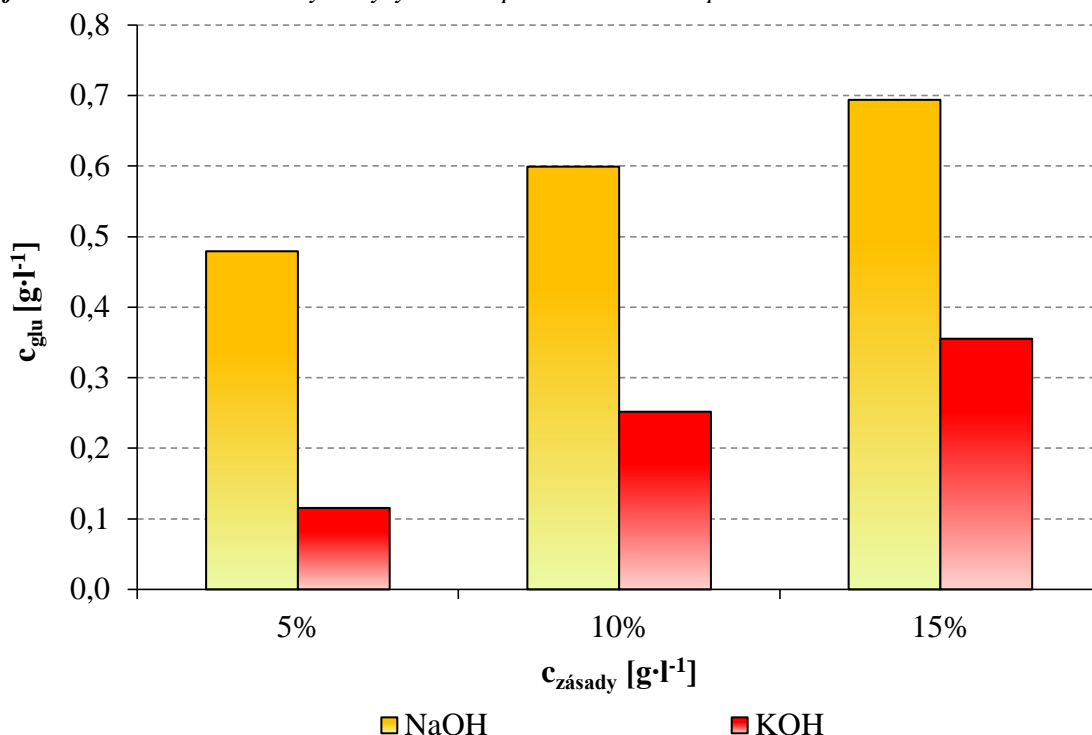
Graf 11: Účinnost alkalické hydrolýzy chleba při teplotě 100 °C



Graf 12: Účinnost alkalické hydrolýzy chleba při teplotě 50 °C



Graf 13: Účinnost alkalické hydrolýzy chleba při laboratorní teplotě



V grafech 11 až 13 je zobrazena účinnost hydrolýzy chleba za použití různých koncentrací hydroxidů při 3 různých teplotách. Z grafů je zřejmé, že největšího efektu hydrolýzy škrobu v chlebu bylo dosaženo při teplotě 50 °C za použití 15% hydroxidu draselného. Při teplotě 100 °C byl účinnější hydroxid sodný. Při srovnání hydrolýz chleba za laboratorní teploty a teploty 100 °C bylo zjištěno, že se konečné výtěžky redukujících cukrů příliš nelišily. Za laboratorní teploty bylo takové efektivnější použití hydroxidu sodného v porovnání s hydroxidem draselným.

3.4 Fyzikální hydrolýzy

Byly provedeny hydrolýzy pomocí ultrazvuku a mikrovln za podmínek uvedených v kapitole 2.7.3 a 2.7.4. Pro stanovení stupně hydrolýzy byla použita analýza metodou podle Somogyi-Nelsona (viz kapitola 2.8.1), pomocí které bylo ve vzorcích odebraných před a po hydrolýze stanoveno množství redukujících cukrů. Pro výpočet koncentrace redukujících cukrů byla použita kalibrační křivka glukosy. Výsledky s intervaly spolehlivosti jsou znázorněny v tabulkách 10 a 11. Stejně jako u chemické hydrolýzy je účinnost hydrolýz vyjádřena jako změna koncentrace redukujících cukrů před a po hydrolýze. Výsledky jsou znázorněny v grafech 14 a 15. Vzhledem k tomu, že intervaly spolehlivosti nabývaly malé hodnoty, nebylo možné je znázornit v grafech jako chybové úsečky.

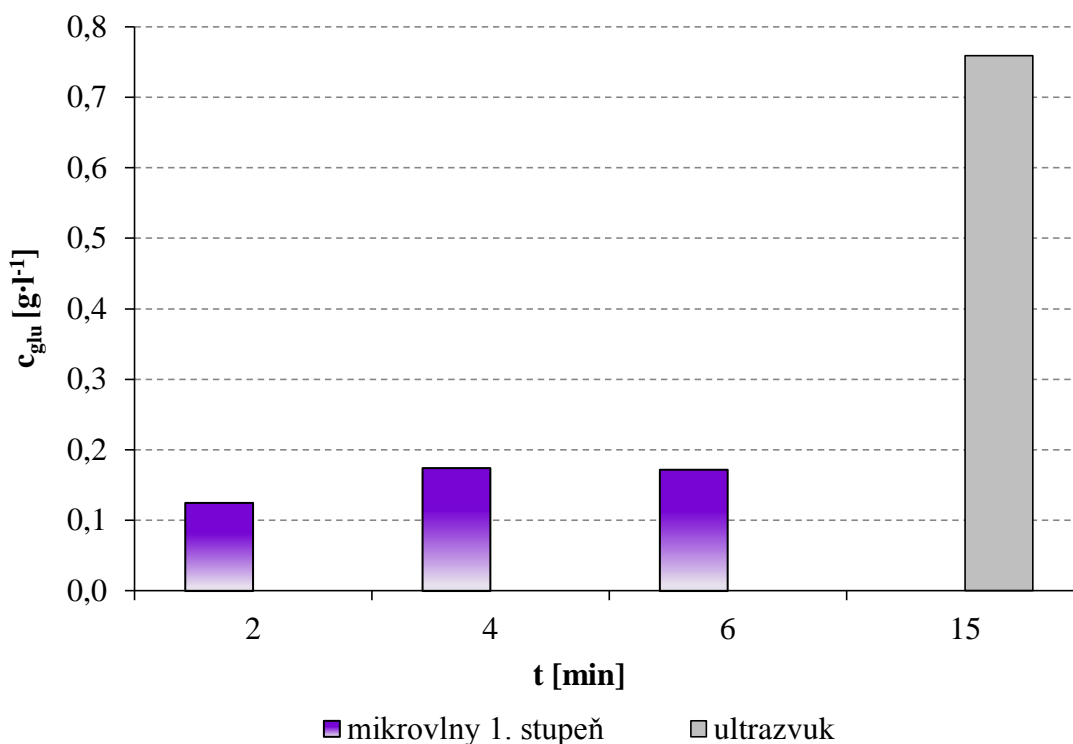
Při vyšších výkonech mikrovlnného zářevu docházelo k želatinaci, absorbování veškeré vody a po vychladnutí k ztuhnutí suspenze. Z baněk se suspenzí pečiva se potom nepodařilo odebrat vzorek pro stanovení obsahu redukujících cukrů. Proto byly rohlíky proměřeny jen při prvním stupni výkonu mikrovlnné trouby. U chleba byla proměřena jen 2 minutová hydrolýza pro všechny stupně výkonu a 4 minutová hydrolýza jen pro první a druhý stupeň výkonu mikrovlnné trouby.

3.4.1 Fyzikální hydrolýza rohlíků

Tabulka 10: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích rohlíků před a po hydrolýze za různých druhů fyzikálních hydrolýz

hydrolýza	čas [min]	před hydrolýzou	po hydrolýze
ultrazvuk	15	$2,78 \pm 0,02$	$3,53 \pm 0,04$
mikrovlny 1. stupeň	2	$2,839 \pm 0,013$	$2,96 \pm 0,02$
	4	$3,26 \pm 0,01$	$3,434 \pm 0,013$
	6	$3,685 \pm 0,013$	$3,86 \pm 0,03$

Graf 14: Účinnost fyzikální hydrolýzy rohlíků



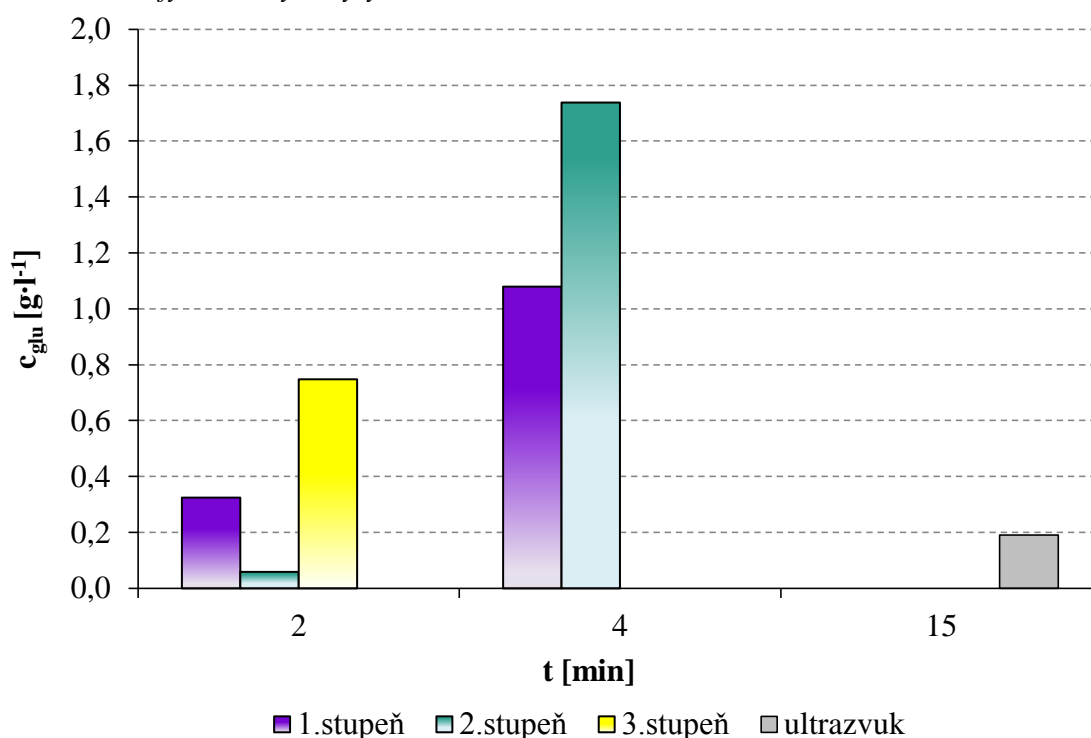
V grafu 14 je znázorněna účinnost hydrolýzy rohlíků za použití mikrovlnné trouby a ultrazvukové lázně. Z grafu je patrné, že největšího účinku hydrolýzy bylo dosaženo při použití ultrazvuku. Účinnost hydrolýz pomocí mikrovln byla podstatně nižší, různá doba záhřevu však neměla zásadní efekt.

3.4.2 Fyzikální hydrolýza chleba

Tabulka 11: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] ve vzorcích chleba před a po hydrolýze za různých druhů fyzikálních hydrolýz

hydrolýza	čas [min]	před hydrolýzou	po hydrolýze
ultrazvuk	15	$4,04 \pm 0,01$	$4,23 \pm 0,02$
mikrovlny 1. stupeň	2	$2,945 \pm 0,007$	$3,270 \pm 0,007$
	4	$2,98 \pm 0,01$	$4,06 \pm 0,01$
mikrovlny 2. stupeň	2	$2,94 \pm 0,01$	$2,99 \pm 0,01$
	4	$1,908 \pm 0,008$	$3,646 \pm 0,007$
mikrovlny 3. stupeň	2	$3,28 \pm 0,01$	$4,03 \pm 0,01$

Graf 15: Účinnost fyzikální hydrolýzy chleba



V grafu 15 je znázorněna účinnost hydrolýzy chleba za použití mikrovlnné trouby a ultrazvukové lázně. Z grafu je patrné, že největšího účinku hydrolýzy bylo dosaženo při použití 2. stupně výkonu mikrovlnné trouby po dobu 4 minuty. I první stupeň výkonu byl efektivnější při použití delší doby záhřevu. Hydrolýza chleba ultrazvukem byla v porovnání s mikrovlnami podstatně méně účinná.

3.5 Srovnání účinnosti hydrolýz

Při celkovém srovnání chemických hydrolýz bez ohledu na druh pečiva lze obecně konstatovat, že se zvyšující se teplotou rostla účinnost hydrolýzy. Tomuto trendu neodpovídá pouze alkalická hydrolýza chleba, při které bylo dosaženo největšího účinku při teplotě 50 °C. Bylo také zjištěno, že se zvyšující se koncentrací kyseliny či zásady rostla efektivita

hydrolýzy. Zároveň je patrné, že použití kyselin mělo větší efekt na zvýšení koncentrace redukujících cukrů v porovnání s použitím hydroxidů.

Porovnání chemické a fyzikální hydrolýzy nelze zobecnit, jelikož se liší v závislosti na druhu pečiva. Lze říct, že fyzikální hydrolýza rohlíků byla méně účinná než chemická hydrolýza. Zároveň hydrolýza rohlíků mikrovlnami byla nejméně efektivní v absolutním srovnání použitých způsobů hydrolýz rohlíků. U fyzikální hydrolýzy chleba se naopak v celkovém srovnání jeví nejméně efektivně hydrolýza ultrazvukem. Hydrolýzu chleba mikrovlnami lze srovnat s některými chemickými hydrolýzami.

Absolutně nejvyššího hydrolytického účinku bylo dosaženo u rohlíků působením 10% kyseliny sírové při teplotě 100 °C, kdy koncentrace redukujících cukrů ve vzorku vzrostla o 5,85 g·l⁻¹. U chleba bylo nejvyššího hydrolytického účinku dosaženo působením 10% kyseliny dusičné, kdy koncentrace redukujících cukrů ve vzorku vzrostla o 4,92 g·l⁻¹.

Obecně lze tvrdit, že druh pečiva neměl zásadní vliv na průběh hydrolýzy. I přesto, že byl stanoven rozdílný obsah škrobu ve vzorku chleba (64,58 ± 0,06 %) a ve vzorku rohlíků (72,0 ± 0,3 %), hydrolýza obou druhů pečiva vykazovala řádově podobné výsledky.

Výsledky z provedených chemických a fyzikálních hydrolýz je možno porovnat s výsledky získané enzymatickou hydrolýzou, kterou se zabývala Ing. Helena Hudečková ve své diplomové práci. Při enzymatické hydrolýze v optimálním uspořádání bylo dosaženo zvýšení koncentrace redukujících cukrů ve vzorku chleba o 70,75 g·l⁻¹. Je tedy zřejmé, že enzymatická hydrolýza je jasně nejúčinnější v porovnání s chemickými a fyzikálními hydrolýzami. Nevýhodou je relativně vysoká cena enzymů. Pro průmyslové využití je tak žádoucí nalézt levnější variantu hydrolýzy [58].

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo studium předúprav polysacharidických odpadních materiálů za účelem zisku maximálního produktu hydrolýzy. Odpadním materiálem byly zvoleny dva druhy pečiva (rohlík a pšenično-žitný chléb). Hlavní náplní experimentální části práce bylo srovnání účinnosti různých typů hydrolýz, jejichž smyslem bylo rozštěpení škrobu obsaženého v pečivu na jednoduché sacharidy.

Byly provedeny hydrolýzy fyzikální a chemické, které byly ještě rozděleny na kyselé a alkalické. Pro kyselé hydrolýzy byly využity kyselina sírová, dusičná a chlorovodíková o třech různých koncentracích a pro alkalické hydrolýzy byly použity hydroxid sodný a draselný taktéž o třech různých koncentracích. Působení chemikálií byly vzorky vystaveny 1 hodinu při 100 °C, 50 °C a laboratorní teplotě. Pro fyzikální hydrolýzy byl využit ultrazvuk a mikrovlnná trouba.

Suché pečivo bylo předupraveno mletím na malé částice a následně byla vytvořena 15% w/v suspenze chleba a vody. Poté byla provedena hydrolýza a byla vyhodnocena její efektivita. Vyhodnocení účinnosti hydrolýz spočívalo ve stanovení rozdílu koncentrace redukujících cukrů v suspenzi před a po hydrolýze. Ze suspenze pečiva byl vždy odebrán vzorek, který byl podroben spektrofotometrickému stanovení obsahu redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona.

Použité pečivo bylo charakterizováno obsahem škrobu a vlhkosti. Obsah škrobu ve vzorku chleba byl určen na $64,58 \pm 0,06 \%$ a ve vzorku rohlíků na $72,0 \pm 0,3 \%$. Obsah vlhkosti ve vzorku chleba byl stanoven na $10,2 \pm 0,8 \%$ a ve vzorku rohlíků na $9,19 \pm 0,95 \%$.

Účinnost hydrolýz byla porovnána s ohledem na použité chemikálie a jejich koncentrace, teplotu a druh pečiva. Z celkového srovnání bylo zjištěno, že se zvyšující se teplotou a i koncentrací kyseliny či zásady rostla účinnost hydrolýzy. I přesto, že byl stanoven rozdílný obsah škrobu ve vzorku chleba a ve vzorku rohlíků, druh pečiva neměl na průběh hydrolýzy zásadní vliv a bylo dosaženo řádově podobných výsledků.

Absolutně nejvyššího hydrolytického účinku bylo dosaženo u rohlíků působením 10% kyseliny sírové při teplotě 100 °C, kdy koncentrace redukujících cukrů ve vzorku vzrostla o $5,85 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. U chleba bylo nejvyššího hydrolytického účinku dosaženo působením 10% kyseliny dusičné, kdy koncentrace redukujících cukrů ve vzorku vzrostla o $4,92 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Účinnost provedených chemických a fyzikálních hydrolýz byla porovnána s enzymatickou hydrolýzou a bylo zjištěno, že enzymatická hydrolýza je výrazně efektivnější. Její nevýhodou je však relativně vysoká cena enzymů a pro případné průmyslové využití je tak žádoucí nalézt levnější variantu hydrolýzy.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MUSSATTO, Solange I., Giuliano DRAGONE, Pedro M.R. GUIMARÃES, João Paulo A. SILVA, Livia M. CARNEIRO, Inês C. ROBERTO, António VICENTE, Lucília DOMINGUES a José A. TEIXEIRA. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*. 2010, Roč. 28, č. 6, s. 817-830. ISSN 07349750. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975010000947>
- [2] HROMÁDKO, Jan, Jiří HROMÁDKO, Petr MILER, Vladimír HÖNIG a Pavel ŠTĚRBA. Výroba bioethanolu. Listy cukrovarnické a řepařské: odborný časopis pro obor cukrovka-cukr. Praha: VUC Praha, a. s. ve spolupráci s ČMCS a SPC, 2010, roč. 126, č. 7-8, s. 267-270. ISSN 1210-3306.
- [3] SÁNCHEZ, Óscar J. a Carlos A. CARDONA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 2008, Roč. 99, č. 13, s. 5270-5295. ISSN 09608524. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407009376>
- [4] BAI, F.W., W.A. ANDERSON a M. MOO-YOUNG. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 2008, Vol. 26, issue 1, s. 89-105. ISSN 07349750. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975007001000>
- [5] PIETRZAK, Witold a Joanna KAWA-RYGIELSKA. Ethanol fermentation of waste bread using granular starch hydrolyzing enzyme: Effect of raw material pretreatment. *Fuel*. 2014, Roč. 134, s. 250-256. ISSN 00162361. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236114005432>
- [6] TOMISOVÁ, Marie. Zbylé pečivo v supermarketech často končí jako odpad. In: muniMEDIA [online]. 2014 [cit. 2015-01-03]. Dostupné z:
<http://www.munimedia.cz/prispevek/zbyle-pecivo-v-supermarketech-casto-konci-jako-odpad-7471/>
- [7] KOSSEVA, Maria, Colin WEBB, C.A. KENT a C.A. KENT. Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities. London: Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-391921-2.
- [8] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin 1. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [9] KADLEC, Pavel. Technologie sacharidů. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000, 138 s. ISBN 80-708-0400-9.
- [10] BULÉON, A., P. COLONNA, V. PLANCHOT a S. BALL. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1998, Roč. 23, č. 2, s. 85-112. ISSN 01418130. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813098000403>
- [11] ČOPIKOVÁ, Jana. Chemie a analytika sacharidů. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1997, 104 s. ISBN 80-708-0306-1.

- [12] PŘÍHODA, Josef. Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin. Vyd. 1. Praha: VŠCHT, 2003, 202 s. ISBN 80-708-0530-7.
- [13] TESTER, Richard F., John KARKALAS a Xin QI. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 2004, Roč. 39, č. 2, s. 151-165. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521003001139>
- [14] PEAT, Stanley, W. J. WHELAN a Gwen J. THOMAS. The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XXII. Evidence of multiple branching in waxy-maize starch. A correction. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1956, Roč. 1956, s. 3025-3030. ISSN 0368-1769. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=jr9560003025>
- [15] ŠÁRKA, Evžen a Zdeněk BUBNÍK. Morfologie, chemická struktura, vlastnosti a možnost využití pšeničného B-škrobu. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, č. 5, s. 318-325. ISSN 0009-2770.
- [16] SINGH, Narpinder, Jaspreet SINGH, Lovedeep KAUR, Navdeep SINGH SODHI a Balmeet SINGH GILL. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*. 2003, Roč. 81, č. 2, s. 219-231. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814602004168>
- [17] COPELAND, Les, Jaroslav BLAZEK, Hayfa SALMAN a Mary Chiming TANG. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*. 2009, Roč. 23, č. 6, s. 1527-1534. ISSN 0268005x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X08002397>
- [18] SMITH, Alison M.. The Biosynthesis of Starch Granules. *Biomacromolecules*. 2001, Roč. 2, č. 2, s. 335-341.
- [19] KADLEC, Pavel. Technologie potravin I. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 300 s. ISBN 80-708-0509-9.
- [20] KUČEROVÁ, Jindřiška, Miloš PELIKÁN a Luděk HŘIVNA. Zpracování a zbožiznalství rostlinných produktů. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 122 s., [3] l. ISBN 978-80-7375-088-6.
- [21] BURRELL, M. M.. Starch: the need for improved quality or quantity-an overview. *Journal of Experimental Botany*. 2003, Roč. 54, č. 382, s. 451-456. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erg049>
- [22] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [23] CARDONA, Carlos A. a Óscar J. SÁNCHEZ. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. 2007, Vol. 98, issue 12, s. 2415-2457. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407000156>

- [24] VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. Enzymologie. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-708-0330-4.
- [25] MONTEIRO DE SOUZA, Paula a Pérola DE OLIVEIRA MAGALHÃES. Application of microbial α -amylase in industry- A review. Brazilian Journal of Microbiology. 2010, Roč. 41, č. 4, s. 850-861. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3769773/>
- [26] PRESEČKI, Ana Vrsalović, Zvezdana Findrik BLAŽEVIĆ a Đurđa VASIĆ-RAČKI. Complete starch hydrolysis by the synergistic action of amylase and glucoamylase: impact of calcium ions. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2013, Vol. 36, issue 11, s. 1555-1562. ISSN 1615-7591. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00449-013-0926-2>
- [27] VAN DER MAAREL, Marc J.E.C, Bart VAN DER VEEN, Joost C.M UITDEHAAG, Hans LEEMHUIS a L. DIJKHUIZEN. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology. 2002, Roč. 94, č. 2, s. 137-155. ISSN 01681656. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165601004072>
- [28] GUPTA, Rani, Paresh GIGRAS, Harapriya MOHAPATRA, Vineet Kumar GOSWAMI a Bhavna CHAUHAN. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry. 2003, Vol. 38, issue 11, s. 1599-1616. ISSN 13595113. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203000530>
- [29] ZAJONCOVÁ, Ludmila a Marek ŠEBELA. Amylasy-význam stanovení jejich aktivity. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2007, roč. 101, č. 1, s. 36-43. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_01_36-43.pdf
- [30] HITESHI, Kalpana a Reena GUPTA. Thermal adaptation of α -amylases: a review. Extremophiles. 2014, Vol. 18, issue 6, s. 937-944. ISSN 1431-0651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-014-0674-5>
- [31] PAYAN, Françoise. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2004, Roč. 1696, č. 2, s. 171-180. ISSN 15709639. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963903003285>
- [32] LEE, Jaeyong a Mark PAETZEL. Structure of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications. 2011, Vol. 67, issue 2, s. 188-192.
- [33] SAUER, Jorgen, Bent W. SIGURSKJOLD, Ulla CHRISTENSEN a Torben P. FRANDSEN. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. Biochimica et Biophysica Acta. 2000, Roč. 29, č. 1543, s. 275-293.
- [34] NIGAM, Poonam, Dalel SINGH a LINKO. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme and Microbial Technology. 1995, Vol. 17, issue 9, s. 770-778. Dostupné z: http://awe.mol.uj.edu.pl/~allele/s6/pliki/mbPrz_seminaria/enzymes%20and%20microbial%20systems.pdf

- [35] NOROUZIAN, Dariush, Azim AKBARZADEH, Jeno M. SCHARER a Murray MOO YOUNG. Fungal glucoamylases. *Biotechnology Advances*. 2006, Vol. 24, issue 1, s. 80-85. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975005000765>
- [36] JAYARAJ, Sujatha, Sukrutha SURESH a Ravi-Kumar KADEPPAGARI. Amylase inhibitors and their biomedical applications. *Starch - Stärke*. 2013, Vol. 65, 7-8, s. 535-542. ISSN 00389056. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/star.201200194>
- [37] NIGAM, Poonam a Dalel SINGH. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995, Vol. 17, issue 9, s. 770-778.
- [38] BALAT, Mustafa a Havva BALAT. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*. 2009, Roč. 86, č. 11, s. 2273-2282. ISSN 03062619. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261909000919>
- [39] HROMÁDKO, Jan, Jiří HROMÁDKO, Petr MILER, Vladimír HÖNIG a Martin CINDR. Technologie výroby biopaliv druhé generace. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, roč. 104č. 8. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_08_784-790.pdf
- [40] HO, Dang P., Huu Hao NGO a Wenshan GUO. A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresource Technology*. 2014, Roč. 169, s. 742-749. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414009870>
- [41] HÖNIG, Vladimír, Petr MILER a Jan HROMÁDKO. Bioethanol jako inspirace do budoucna. *Listy cukrovarnické a řepařské: odborný časopis pro obor cukrovka-cukr*. Praha: VUC Praha, a. s. ve spolupráci s ČMCS a SPC., 2008, roč. 124, 7-8, s. 203-206. ISSN 1210-3306.
- [42] BALAT, Mustafa a Havva BALAT. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*. 2009, Vol. 86, issue 11, s. 2273-2282. ISSN 03062619. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261909000919>
- [43] VARGA, Eniko, Anette S. SCHMIDT, Kati RECZEY a Anne Belinda THOMSEN. Pretreatment of Corn Stover Using Wet Oxidation to Enhance Enzymatic Digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003, Vol. 104, issue 1, s. 37-50.
- [44] BALAT, Mustafa, Havva BALAT a Cahide ÖZ. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008, Roč. 34, č. 5, s. 551-573. ISSN 03601285. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360128507000706>
- [45] ALVIRA, P., E. TOMÁS-PEJÓ, M. BALLESTEROS a M.J. NEGRO. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010, Roč. 101, č. 13, s. 4851-4861. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409015983>

- [46] ŠULÁK, Martin a Daniela ŠMOGROVIČOVÁ. Bioethanol: současné trendy vo výskume a v praxi. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2008, roč. 102, č. 2, s. 108-112. ISSN 0009-2770.
- [47] REBROŠ, Martin, Michal ROSENBERG, Ľudmila KRIŠTOFÍKOVÁ a Radek STLOUKAL. Mikrobiálna produkcia palivového etanolu: baktérie alebo kvasinky?. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2005, roč. 99, č. 6, s. 402-409. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_06_402-409.pdf
- [48] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.
- [49] PANDEY, Ashok, Christian LARROCHE, Steven RICKE, Claude-Gilles DUSSAP a Edgard GNANSOUNOU. Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes. 1. Burlington, MA: Academic Press, 2011, xi, 629 p. ISBN 01-238-5099-1. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBAFCP00A/biofuels-alternative/biofuels-alternative>
- [50] GUSTAVSSON, Jenny, Christel CEDERBERG, Ulf SONESSON, Robert VAN OTTERDIJK a Alexandre MEYBECK. Global food losses and food waste: extent, causes and prevention : study conducted for the International Congress "Save Food!". Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. ISBN 978-925-1072-059. Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e.pdf>
- [51] UÇKUN KIRAN, Esra, Antoine P. TRZCINSKI, Wun Jern NG a Yu LIU. Bioconversion of food waste to energy: A review. Fuel. 2014, Roč. 134, s. 389-399. ISSN 00162361. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236114005365>
- [52] PLEISSNER, Daniel a Carol Sze K LIN. Valorisation of food waste in biotechnological processes. Sustainable Chemical Processes. 2013, Roč. 1, č. 21, s. 21-. ISSN 2043-7129. Dostupné z: <http://www.sustainablechemicalprocesses.com/content/1/1/21>
- [53] EBRAHIMI, Fatemeh, Morteza KHANAHMADI, Shapoor ROODPEYMA a Mohammad J. TAHERZADEH. Ethanol production from bread residues. Biomass and Bioenergy. 2008, Roč. 32, č. 4, s. 333-337. ISSN 09619534. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953407001936>
- [54] KAWA-RYGIELSKA, Joanna, Witold PIETRZAK a Anna CZUBASZEK. Characterization of fermentation of waste wheat-rye bread mashs with the addition of complex enzymatic preparations. Biomass and Bioenergy. 2012, Roč. 44, s. 17-22. ISSN 09619534. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953412001870>

- [55] VOHRA, Mustafa, Jagdish MANWAR, Rahul MANMODE, Satish PADGILWAR a Sanjay PATIL. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2014, Roč. 2, č. 1, s. 573-584. ISSN 22133437. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213343713002054>
- [56] NOMANBHAY, Saifuddin, Refal HUSSAIN, Md. Mujibur RAHMAN a Kumaran PALANISAMY. Review paper Integration of Biodiesel and Bioethanol Processes: Conversion of Low Cost Waste Glycerol to Bioethanol. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 2012, Roč. 6, č. 6, s. 802-818.
- [57] AMIN, Sarmidi. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*. 2009, Roč. 50, č. 7, s. 1834-1840. ISSN 01968904. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890409000764>
- [58] HUDEČKOVÁ, Helena. Studie možnosti využití odpadního pečiva k bioprodukci vybraných metabolitů. Brno, 2014. . Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [59] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [60] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravín: Cvičenie*. 2. vyd. Bratislava: STU, 1991, 394 s. ISBN 80-227-0398-2.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	adenosintrifosát
HCl.....	kyselina chlorovodíková
hm. %	hmotnostní procenta
HNO ₃	kyselina dusičná
H ₂ SO ₄	kyselina sírová
KOH	hydroxid draselný
NaOH	hydroxid sodný
SmF	submerzní fermentace
SSF	simultánní sacharifikace s fermentací

SEZNAM POUŽITÝCH VELIČIN

A	absorbance
c	hmotnostní koncentrace [g·l ⁻¹] nebo [g·ml ⁻¹]
t	čas [min]

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Amylosa [13]	9
Obrázek 2: Amylopektin [13].....	10
Obrázek 3: Fotografie škrobových zrn z různých zdrojů pořízené rastrovacím elektronovým mikroskopem [16].	11
Obrázek 4: Druhy enzymů využívané pro degradaci škrobu [27].....	14
Obrázek 5: Struktura α -amylasy [31]	15
Obrázek 6: Struktura glukamylasy [32]	16
Obrázek 7: Technologický postup výroby biopaliv první a druhé generace [39].	18
Obrázek 8: Metabolismus alkoholového kvašení kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [4]. ...	21
Obrázek 9: Metabolismus alkoholového kvašení bakterie <i>Zymomonas mobilis</i> [4].	22

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Kalibrační křivka glukosy	33
Tabulka 2: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích rohlíků před hydrolýzou za použití různých koncentrací kyselin a teplot	34
Tabulka 3: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích rohlíků před hydrolýzou za použití různých koncentrací hydroxidů a teplot	35
Tabulka 4: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích rohlíků po hydrolýze za použití různých koncentrací kyselin a teplot	35
Tabulka 5: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích rohlíků po hydrolýze za použití různých koncentrací hydroxidů a teplot.....	35
Tabulka 6: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích chleba před hydrolýzou za použití různých koncentrací kyselin a teplot	39
Tabulka 7: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích chleba před hydrolýzou za použití různých koncentrací hydroxidů a teplot	40
Tabulka 8: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích chleba po hydrolýze za použití různých koncentrací kyselin a teplot	40
Tabulka 9: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích chleba po hydrolýze za použití různých koncentrací hydroxidů a teplot.....	40
Tabulka 10: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích rohlíků před a po hydrolýze za různých druhů fyzikálních hydrolýz.....	45
Tabulka 11: Hodnoty koncentrací redukujících cukrů $[g \cdot l^{-1}]$ ve vzorcích chleba před a po hydrolýze za různých druhů fyzikálních hydrolýz.....	46

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Kalibrační křivka glukosy	34
Graf 2: Účinnost kyselé hydrolýzy rohlíků při teplotě 100 °C.....	36
Graf 3: Účinnost kyselé hydrolýzy rohlíků při teplotě 50 °C.....	36
Graf 4: Účinnost kyselé hydrolýzy rohlíků při laboratorní teplotě	37
Graf 5: Účinnost alkalické hydrolýzy rohlíků při teplotě 100 °C.....	38
Graf 6: Účinnost alkalické hydrolýzy rohlíků při teplotě 50 °C	38
Graf 7: Účinnost alkalické hydrolýzy rohlíků při laboratorní teplotě	39
Graf 8: Účinnost kyselé hydrolýzy chleba při teplotě 100 °C.....	41
Graf 9: Účinnost kyselé hydrolýzy chleba při teplotě 50 °C.....	41
Graf 10: Účinnost kyselé hydrolýzy chleba při laboratorní teplotě	42
Graf 11: Účinnost alkalické hydrolýzy chleba při teplotě 100 °C	43
Graf 12: Účinnost alkalické hydrolýzy chleba při teplotě 50 °C	43
Graf 13: Účinnost alkalické hydrolýzy chleba při laboratorní teplotě	44
Graf 14: Účinnost fyzikální hydrolýzy rohlíků	45
Graf 15: Účinnost fyzikální hydrolýzy chleba	46